

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG
VON
CHOLIN - ACETYLTRANSFERASE
AUS
SCHWEINEHIRN

Axel Braun

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON CHOLIN - ACETYLTRANSFERASE
AUS SCHWEINEHIRN

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Axel Braun
aus Ludwigshafen

Dissertation eingereicht am 28. 4. 1986

1. Gutachter : Prof. Dr. H. Thoenen

2. Gutachter : Prof. Dr. E. - L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung : 31. 7. 1986



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

Die vorliegende Arbeit wurde ohne fremde Hilfe auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. H. Thoenen in der Abteilung Neurochemie des Max - Planck - Instituts für Psychiatrie durchgeführt.

Prof. Dr. H. Thoenen, Dr. R. Heumann und insbesondere Dr. Y.-A. Barde danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Prof. Dr. D. Oesterhelt danke ich für die Synthese des Oligonukleotids CAT/L1.

F. Scholz - Marb danke ich für die Bereitstellung der Zellkulturüberstände des monoklonalen Anti - ChAT - Antikörpers.

R. Wolske danke ich für die anregenden Diskussionen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2.	EINLEITUNG.....	4
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	7
3.1.	Material und Lösungen.....	7
3.2.	Synthese von [1- ¹⁴ C] - Acetyl - Coenzym A.....	11
3.3.	Messung der ChAT - Aktivität.....	12
3.4.	Proteinbestimmung.....	12
3.5.	Reinigung von ChAT.....	13
3.6.	Reinigung der schweren Kette des monoklonalen Anti-ChAT-Antikörpers.....	17
3.7.	Analytische SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese.....	17
3.8.	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung.....	18
3.9.	Manuelle N - terminale Proteinflüssigphasense - quenzierung.....	18
3.10.	Maschinelle N - terminale Proteingasphasense - quenzierung.....	20
3.11.	Maschinelle Oligonukleotidsynthese.....	21
3.12.	Herstellung der Molekulargewichtsmarker für die Reinigung des Oligonukleotids.....	22
3.13.	Reinigung des Oligonukleotids.....	23
3.14.	³² P - Endmarkierung von Oligonukleotiden.....	24
3.15.	Isolierung von Gesamt - RNA.....	25
3.16.	Isolierung von Poly(A) ⁺ mRNA.....	27
3.17.	Agarosegelelektrophorese von denaturierter RNA.....	28
3.18.	Übertragen der RNA von Agarosegelen auf Nitro - zellulose.....	29
3.19.	Hybridisierung.....	30
3.20.	"Dotblots".....	31

4.	ERGEBNISSE.....	32
4.1.	Reinigung von ChAT.....	32
4.1.1.	Allgemeine Reinigungsdaten.....	32
4.1.2.	Entwicklung und Anwendung des Elektroelutions - systems.....	36
4.2.	Molekulare Charakterisierung von ChAT.....	41
4.2.1.	Aminosäurezusammensetzung.....	41
4.2.2.	Bestimmung der N - terminalen Proteinsequenz.....	44
4.2.2.1.	Flüssigphasensequenzierung.....	44
4.2.2.2.	Gasphasensequenzierung.....	46
4.3.	Versuche zum Nachweis der mRNA von ChAT.....	52
4.3.1.	Synthese und Reinigung des Oligonukleotids CAT/L1.....	52
4.3.2.	Anwendung von CAT/L1 im "Northern Blot".....	57
5.	DISKUSSION.....	60
5.1.	Vorgehensweise.....	60
5.2.	Reinigung.....	61
5.3.	Molekulare Charakterisierung.....	65
5.4.	Versuche zum Nachweis der mRNA von ChAT.....	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	73

Liste der Abkürzungen

ChAT	Cholin-Acetyltransferase
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
BSA	Rinderserumalbumin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
DEP	Diethyl-pyrocarbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
DABITC	4-(Dimethylamino)azobenzol-4'-isothiocyanat
OPA	ortho-Phthalaldehyd
PITC	Phenylisothiocyanat
HPRT	Hypoxanthin-guanin-Phosphoribosyltransferase
GST	Gluthation-S-Transferase
OD	Optische Einheiten
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Bis -	N,N'-Methylenbisacrylamid
acrylamid	
mAB	monoklonaler Antikörper
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CAT/L1	Eigenname des Oligonukleotids
e.g.	"electrophoresis grade"
b	Basen
dal	Dalton
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ether	Diethylether
TFA	Trifluoressigsäure
Poly(A) ⁻	RNA ohne Poly(A)-Schwanz
Poly(A) ⁺	RNA mit Poly(A)-Schwanz
Hind III	Restriktionsendonuclease
Bam HI	Restriktionsendonuclease
Sma I	Restriktionsendonuclease
EcoR I	Restriktionsendonuclease

SSC	Zusammensetzung in 3.1.
Puffer A	Zusammensetzung in 3.1.
TDG-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.
Trispuffer	Zusammensetzung in 3.1.
Sma-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.
STE-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.
Melera A	Zusammensetzung in 3.1.
Melera B	Zusammensetzung in 3.1.
Melera C	Zusammensetzung in 3.1.
E-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.
B-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.
I-Puffer	Zusammensetzung in 3.1.

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Enzym Cholin - Acetyltransferase (ChAT; E.C.2.3.1.6.) aus Schweinehirn eine etablierte Reinigungsmethode optimiert. So konnte die Isolierung unter wesentlich vermindertem Zeitaufwand wie zuvor durchgeführt werden. Dadurch wurde die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und eines Teils der N - terminalen Sequenz von ChAT möglich. Mit Hilfe eines nach diesen Sequenzdaten synthetisierten Oligonukleotids konnte ein erster Hinweis auf die Natur der mRNA von ChAT im "Northern Blot" erzielt werden.

Eine präparative Gelelektrophorese, gefolgt von einem System zur elektrophoretischen Elution von Proteinen aus Gelen wurden als letzte Schritte der Reinigung verwendet. Dadurch konnte die nichtkovalente Immunaффinitätschromatographie nach Eckenstein und Thoenen (1982) zur wesentlichen Vereinfachung der ursprünglichen Reinigungsmethode von ChAT nach Eckenstein et al. (1981) eingesetzt werden. Nach sechs Reinigungsschritten wurde ein theoretischer Reinigungsfaktor von 10^6 erzielt. Die theoretische spezifische Aktivität von ChAT betrug danach 59 339 Einheiten/mg Protein. Ausgehend von 10 kg Schweinehirn konnten durchschnittlich 66 µg ChAT mit einer Reinheit von über 90% in sequenzierfähiger Form isoliert werden. Die theoretisch ermittelte Ausbeute betrug 6%. Dieses Reinigungsverfahren stellt zur Zeit das einzige dar, welches zu nachweislich sequenzierbarer ChAT führt.

Das dazu entwickelte elektrophoretische Elutionssystem besteht im wesentlichen aus einem, von einer Pipettenspitze abnehmbaren und mit einer Dialysemembran verschlossenen, Glasröhrchen zwischen einem Anoden - und einem Kathodenteil. Zur Elution wird eine 7 mM Lösung von Triethylamin in Wasser benützt. Proteine mit einem Molekulargewicht möglichst kleiner als 94 kdal und einem sauren bis schwach basischen

isoelektrischen Punkt werden auf Grund des pH_s von 10 - 12 in der Lösung als Anionen auf der Dialysemembran angereichert. Diese Proteine können dann ohne Abtrennung von SDS oder Salz enthaltenden Puffern direkt nach Lyophilisierung des Eluates zur molekularen Charakterisierung eingesetzt werden. Vor allem darin, sowie in der technisch einfachen Handhabung des Elutionssystems, besteht ein wesentlicher Vorteil gegenüber bereits etablierten Systemen. Dies gilt insbesondere, wenn mit Proteinmengen im μg - Bereich gearbeitet wird und in Hinblick auf Materialverlust jeder weitere Reinigungsschritt zu vermeiden ist.

Die Aminosäurezusammensetzung von 0.5 μg (7pmol) so gereinigter ChAT, allerdings ohne Werte für Prolin, Cystein und Tryptophan, stellt die erste verlässliche Bestimmung für ChAT aus neuronalem Gewebe dar.

Durch manuelle Flüssigphasensequenzierung von etwa 300 pmol ChAT konnte gezeigt werden, daß der N - Terminus des Proteins weder in vivo noch durch die Präparation so stark blockiert worden war, daß die Bestimmung N - terminaler Aminosäuren im pmol - Bereich nicht mehr möglich gewesen wäre. Eindeutig konnten so die dritte und vierte N - terminale Aminosäure bestimmt werden. Durch Gasphasensequenzierung von etwa 250 pmol ChAT wurden diese beiden Aminosäuren bestätigt und die erste und zweite und fünfte bis dreizehnte N - terminale Aminosäure bestimmt. Die Proteinsequenzdaten stellen die ersten für ChAT in der Literatur publizierten dar. Durch Sequenzierung der schweren Kette des zur Reinigung benützten Anti - ChAT - Antikörpers konnte die 9%ige Kontaminante der ChAT - Präparation als dieses Protein identifiziert werden. Sobald Nukleinsäuresequenzdaten der mRNA oder des Gens von ChAT bekannt sind, können mit Hilfe dieser N - terminalen Proteinteilsequenz ihr Leserahmen und der Start der proteinkodierenden Sequenz von ChAT festgelegt werden. Dies ist möglich, wenn die Nukleinsäuredaten von der Spezies Schwein stammen oder wenn

zu den Daten von ChAT anderer Spezies genügend große Homologie besteht.

Auf Grund der N - terminalen Teilsequenz von ChAT wurde ein 38 Basen langes, nichtverzweigtes Oligonukleotid maschinell synthetisiert und gelelektrophoretisch gereinigt. Durch Hybridisierung dieses Oligonukleotids mit Poly(A)⁺mRNA aus Schweinehirnstamm konnte ein Signal in der Region leicht über 4.7 kb erhalten werden. Folgende Daten weisen auf die Spezifität des Hybridisierungssignals für die mRNA von ChAT hin. Das Signal erscheint bei einer Hybridisierungstemperatur von 28°C aber nicht 33°C. Es fehlt in der Poly(A)⁻RNA - Präparation. Schließlich handelt es sich bei dem verwendeten Oligonukleotid um eine für ChAT auf der Grundlage der bekannten Sequenzen spezifische Probe. Mit diesem Oligonukleotid sollte ein für ChAT spezifischer Klon durch Koloniehybridisierung in einer Genbank nachgewiesen werden können.

2. EINLEITUNG

Aufgabe des Nervensystems ist die Informationsverarbeitung und Steuerung von Körperfunktionen. Dazu stehen im menschlichen Gehirn etwa 10^{12} Nervenzellen zur Verfügung. Im Zentralnervensystem sind diese Zellen in hohem Maße untereinander, in der Peripherie mehr mit den Zellen der Zielorgane verschaltet. Informationsübermittlung zwischen diesen Zellen erfolgt mittels elektrischer wie chemischer Signale, letzteres vor allem bei höheren Vertebraten in Form der sogenannten Neurotransmitter. Bis jetzt sind etwa 50 Moleküle dieser Funktion bekannt oder vermutet (Black et al. 1984). Auf Grund unterschiedlicher Wirkungsmechanismen unterscheidet man zwischen den klassischen, nichtpeptidergen und den Peptidtransmittern (Kandel 1983).

Dale stellte die Hypothese auf, daß das Acetylcholin ein Molekül sei, welches für die chemische Weiterleitung von elektrischen Signalen im Nervensystem verantwortlich ist (Fulton und Nachmansohn 1943). Im Jahr 1943 lieferten Nachmansohn und Machado durch Bestimmung einer acetylcholin-synthetisierenden Enzymaktivität (ChAT) in Homogenaten von Ratten -, Katzen - und Meerschweinengehirn einen wesentlichen experimentelle Beitrag zu ihrer Verifizierung. Gut angereichertes Gewebe existiert für ChAT nicht. Zusätzlich erwies sich ChAT während der Reinigung als recht labil. Deshalb dauerte es, obwohl in der Zwischenzeit eine Reihe sogenannter Reinigungen veröffentlicht worden waren (für ausführliche Übersichtsartikel siehe Rossier 1977 und Malte-Sørensen 1979), noch fast weitere vierzig Jahre bis erste Reinigungen, die allgemein als homogen oder fast homogen anerkannt wurden, veröffentlicht wurden. Diese stammten von Brandon und Wu (1978), für die ChAT aus *Torpedo californica*, von Cozzari und Hartman (1980) aus Rinder Nucleus caudatus, von Dietz und Salvaterra (1980) aus Rattenhirn, von Eckenstein et al. (1981) aus Schweinehirn

und von Slemmon et al. (1982) aus *Drosophila melanogaster* isoliert worden war. Bis heute wird diskutiert, ob eine oder mehrere molekulare, isoelektrische und subzelluläre Formen des Enzyms für verschiedene Spezies existieren. Auch die für ein Protein definitiven biochemischen Charakteristika wie Aminosäurezusammensetzung und Proteinsequenz existieren für ChAT bis jetzt nur in Form der erst kürzlich von Bruce et al. (1985) veröffentlichten Aminosäurezusammensetzung für ChAT aus menschlicher Plazenta. Teile der Proteinsequenz oder die von einer cDNA für ChAT abgeleitete gesamte Sequenz könnten einen wesentlichen Beitrag zur Klärung dieser offenen Fragen liefern. Im Jahr 1982 wurde von Lamouroux et al. erstmals ein cDNA - Klon eines neurotransmitter-synthetisierenden Enzyms isoliert. Dabei handelte es sich um das Enzym Tyrosinhydroxylase, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Biosynthesereihe für den zweiten klassischen Neurotransmitter, das Noradrenalin, katalysiert. Mit Hilfe dieses Klones konnten Grima et al. im Jahr 1985 einen weiteren Klon für Tyrosinhydroxylase isolieren, der fast so lang wie die entsprechende mRNA war. Da aber bis heute Proteinsequenzdaten weder des N - terminalen Endes noch anderer Bereiche existieren, konnte weder der Leserahmen noch der Anfang der proteinkodierenden Sequenz eindeutig angegeben werden.

Zur chemischen Informationsübermittlung können von einem Neuron auch mehr als ein Transmitter benutzt werden (Lundberg und Hökfelt 1983). Zusätzlich dazu können bestimmte Neuronen des peripheren Nervensystems, vor allem während der Entwicklung wie auch im Adulten, den benutzten Neurotransmitter wechseln. Auf Grund mehrerer Hinweise in letzter Zeit gilt das wahrscheinlich auch für das Zentralnervensystem (Black et al. 1984). Das klassische Beispiel eines solchen Wechsels des Transmitters wurde von Patterson und Chun (1974) beschrieben. Sie konnten zeigen, daß die Wahl des Transmitters, ob cholinerg oder adrenerg, sympathischer Neuronen von neugeborenen Ratten in Kultur von

der Anwesenheit bestimmter nichtneuronaler Zellen abhängt. Der Wechsel von adrenerg zu cholinerg konnte von Fursphan et al. (1976) und Reichardt und Patterson (1977) besonders gut an einzelnen solchen Neuronen in Mikrokulturen nachgewiesen werden. Konditioniertes Medium von nichtneuronalen Zellen zeigt einen vergleichbaren Effekt auf die Wahl des Transmitters wie bei Anwesenheit bestimmter nichtneuronaler Zellen. So gelang es Weber (1981) 1500 - fach und Fukada (1985) 10^5 - fach ein Glykoprotein dieser Aktivität mit einem ungefähren Molekulargewicht von 45 kdal aus konditioniertem Medium von Rattenherzmuskelzellen anzureichern. Diese in vitro erzielten Ergebnisse sind wahrscheinlich generell auf Grund des Fehlens der neuronalen Innervation nicht direkt auf die in vivo Situation übertragbar (Patterson 1979). Allerdings konnte Landis (1983) für eine bestimmte Subpopulation von sympathischen Neuronen in vivo die von Patterson und Chun beobachteten Effekte bestätigen. Weitere Hinweise auf molekularer Ebene auf den zu Grunde liegende Mechanismus in den Neuronen könnten mit Hilfe einer cDNA - Probe für ChAT gewonnen werden. So konnten zum Beispiel Mallet et al. (1983) mit der bereits beschriebenen cDNA - Probe für Tyrosinhydroxylase in chromaffinen Nebennierenmarkzellen der Ratte unter Bedingungen der Transsynaptischen Induktion der Tyrosinhydroxylase (Thoenen et al. 1969) auch einen Anstieg an spezifischer mRNA nachweisen.

Diese Arbeit sollte durch Bestimmung von proteinchemischen Daten das Enzym ChAT besser molekular charakterisieren. Dadurch sollte eine spätere Klonierung von ChAT wie die Interpretation der erhaltenen Nukleinsäuredaten ermöglicht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material und Lösungen

Coenzym A, Acetanhydrid, Cholinchlorid, Eserin, BSA, PMSF, Natriumthioglykolat, Aminosäuren, Myoglobin, Phosphorylase b, Carbonische Anhydrase B, Hydroxychinolin, DEP, DNA, Spermidin und Polyvinylpyrrolidon wurden von Sigma bezogen; CM - Sephadex C 50, Protein A - Sepharose, Oligo - dT - Nukleotide (12-18), Sephadex G 50, Ficoll, Molekulargewichtsmarker und Dextransulfat wurden von Pharmacia bezogen; $[1-^{14}\text{C}]$ - Acetanhydrid und $[\gamma-^{32}\text{P}]$ - ATP wurden von Amersham geliefert; SDS (e.g.), Acrylamid (e.g.), Bisacrylamid (e.g.), Mercaptoethanol (e.g.), Ammoniumpersulfat (e.g.), Harnstoff (e.g.), Ag 501 x 8 und TEMED wurden von BioRad bezogen; Dialyseschläuche, "Coomassie brilliant blue" (Serva Blau R), Xylencyanol und Bentonit wurden von Serva erhalten; Heptan (p.A.), Ethylacetat (p.A.), Butylacetat (p.A.), Essigsäure (p.A.), Toluol (p.A.), n - Hexan (p.A.), Chloroform (p.A.), Phenol (p.A.), Formamid (p.A.), EDTA (p.A.), DTT (p.A.), Glyzerin, Tris (p.A.), KHCO_3 (p.A.), Diethylether (p.A.), NaOH (p.A.), PPO (für Szintillationsmessungen), Aceton (p.A.), Acetonitril (p.A.), Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat (p.A.), LiCl (p.A.), CaCl_2 (p.A.), NaH_2PO_4 (p.A.), NaCl (p.A.), NaN_3 (p.A.), KCl (p.A.), MgCl_2 (p.A.), Natriumacetat (p.A.), Natriumcitrat (p.A.), Ammoniumacetat (p.A.), Borsäure (p.A.), Isoamylalkohol (p.A.), Ammoniumsulfat (p.A.), NaHCO_3 (p.A.), Ameisensäure (p.A.) und Bromphenolblau wurden von Merck bezogen; Dialyseschläuche für die Elution wurden von Spektrapor bezogen; Triethylamin (sequencing grade), DABITC und OPA (Fluoropac TM Dichex) wurden von Pierce bezogen; Glasröhrchen zum Handsequenzieren wurden von Antech GmbH bezogen; Pyridin (ultropac), PITC (ultropac), TFA (ultropac) waren von LKB; Polyacrylamiddünnschichtplatten und Nitrozellulose wurden von Schleicher und Schüll erhalten;

der SP 64 Vektor war ein Geschenk von Dr. A. Shaw (Biogen, Genf); Hind III, Bam HI, SmaI, Alkalische Phosphatase, tRNA, T4 - Polynukleotidkinase, Citrat - Synthase und Proteinase K stammten von Boehringer Mannheim; EcoRI stammte von Biolabs; die Autoradiographiefilme stammten von Fuji (RX medical); wasserfreies Ethanol (p.A.) wurde von Roth bezogen; der Homogenisator mit Glas - Teflon - Einsatz stammte von B.Braun; die Oligo - dT - Zellulose wurde von Paesel bezogen; DNase und RNasefreies BSA wurden von Miles Scientific bezogen; Agarose (ultrarein) und Hind - Puffer stammten von BRL; Glyoxal (40% in Wasser), Ammoniumhydrogencarbonat (purum p.A.); 3 - Mercaptopropionsäure (purissima) und Dimethylsulfoxid (p.A.) stammten von Fluka; 37%ige HCl und Methanol (p.A.) waren von Riedel-de Haën; Aqualuma war von Baker und 3 MM Filterpapier von Whatman.

Lösungen

Puffer A 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5.7
 100 mM NaCl

TDG - Puffer 20 mM Tris/HCl, pH 7.8
 50 mM NaCl
 1 mM DTT
 10 % Glyzerin

Trispuffer 200 mM Tris/HCl, pH 8.5
 0.05 % NaN_3

Probenpuffer 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8
 0.01 % Bromphenolblau
 2.25 % SDS
 5 % Mercaptoethanol
 15 % Glyzerin

Sma - Puffer	15 mM Tris/HCl, pH 8.5 15 mM KCl 6 mM MgCl ₂ 6 mM Mercaptoethanol
STE - Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 M NaCl 10 mM EDTA
Triskinasepuffer	500 mM Tris/HCl, pH 7.6 100 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 1 mM Spermidin 1 mM EDTA
Melera - A	100 mM Natriumacetat, pH 6.0 1 mM EDTA 20 % Bentonitlösung (4%ig in Wasser) 0.75 % SDS
Melera - B	100 mM Tris/Essigsäure, pH 8.5 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Bentonitlösung (4%ig in Wasser) 2 % SDS
Melera - C	100 mM Tris/Essigsäure, pH 8.5 700 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Bentonitlösung (4%ig in Wasser) 2 % SDS
E - Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 1 mM EDTA 0.05 % SDS

B - Puffer 10 mM Tris/HCl, pH 7.5
 500 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0.25 % SDS

I - Puffer 10 mM Tris/HCl, pH 7.5
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0.5 % SDS

1xSSC 150 mM NaCl/HCl, pH 7.0
 15 mM Natriumcitrat

Vorhybridisierungslösung

 50 % Formamid
 3x SSC
 10 % 50xDenhardts
 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5
 0.1 % SDS
 4mg/10ml DNA

Hybridisierungslösung

 50 % Formamid
 3x SSC
 2 % 50xDenhardts
 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.5
 0.1 % SDS
 10 % Dextransulfat (in DEP - Wasser
 lösen durch dreistündiges
 Rühren bei Raumtemperatur)
 2mg/10ml DNA

50xDenhards	5 g Ficoll
	5 g Polyvinylpyrrolidon
	5 g RNasefreies BSA
	in 500 ml Wasser lösen und mit DEP
	kochen; dann BSA zugeben.

DNase/Proteinase -	1 mg/ml DNase und 1 mg/ml Proteinase K
Lösung	in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5

3.2. Synthese von $[1-^{14}\text{C}]$ - Acetyl - Coenzym A

Die Reaktion wurde auf der Grundlage von Oesch et al. (1973) in der wie im folgenden beschriebenen modifizierten Form auf Eis durchgeführt. Dazu wurden 24 mg Coenzym A (30 μmol) in möglichst wenig 1 M KHCO_3 gelöst und sofort zu 62.5 μmol $[1-^{14}\text{C}]$ - Acetanhydrid mit einer spezifischen Aktivität von 16 mCi/mmol gegeben und zwanzig Minuten gerührt. Nach Zugabe von 5 μl kalter Acetanhydridlösung wurde weitere 10 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde dann mit etwa 120 μl 4 M HCl abgestoppt. Der pH der Lösung sollte aber keinesfalls unter 2 liegen. Danach wird sechsmal mit gleichem Volumen an kaltem HCl-gesättigtem Ether gewaschen und die Ether - Phase verworfen. Zum Schluß wird der pH der Lösung erst mit 1 M dann mit 0.1 M NaOH vorsichtig auf 6.0 eingestellt. Ein zu hoher Wert würde gebildetes Acetyl - Coenzym A sofort wieder in Coenzym A und Natriumacetat zersetzen. Die Menge an gebildetem Acetyl - Coenzym A wurde nach Tubbs und Garland (1969) durch Umsetzung mit Citrat - Synthase bestimmt. Das Maß an radioaktivem Einbau wurde durch Zählung des Endproduktes im Zähler ermittelt. Die Ausbeute bezogen auf die Molarität betrug 83% und bezogen auf die Radioaktivität 50%. Damit ergab sich eine spezifische Aktivität von 5 mCi/mmol.

3.3. Messung der ChAT - Aktivität

Die Messung der Aktivität erfolgte nach Fonnum (1975). 10 µl Probenlösung wurden bei 37°C im Wasserbad mit 10 µl Substratlösung inkubiert. Die Substratlösung ist 10 mM an Cholin, 0.2 mM an Eserin, 300 mM an NaCl, 50 mM an Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 7.4 und enthält pro 10 µl 4 nmol von obigem [1-¹⁴C] - Acetyl - Coenzym A. Die Reaktion wurde nach 5 bis 20 Minuten durch Verdünnung mit 5 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.4 direkt im Zählröhrchen abgestoppt. Nach Zugabe von 2 ml Acetonitril (Merck zur Rückstandsanalyse) mit 0.5% Natriumtetraphenylborat und 7 ml Toluol, das 0.5% PPO enthält, konnte durch zehnmaliges Schütteln das gebildete Acetylcholin in die organische Phase extrahiert und gezählt werden. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde wie im Fall der Bestimmung der Probe verfahren, nur daß stattdessen der Puffer der Probe alleine gemessen wurde. Zur Bestimmung des Standards wurden 10 µl Substratlösung mit 7 ml Aqualuma versetzt und die gesamte Radioaktivität gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{(P-L)[\text{cpm}]}{S[\text{cpm}]} \cdot \frac{A[\text{nmol}]}{T[\text{min}]} \cdot 100 = X[\text{nmol}][\text{min}]^{-1}$$

P : Probe T : Zeit L : Leerwert;

S : Standard X : Aktivität

A : Menge an [1-¹⁴C] - Acetyl - Coenzym A

Eine enzymatische Einheit entspricht der Bildung von 1 nmol [1-¹⁴C] - Acetylcholin.

3.4. Proteinbestimmung

Proteinmessungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. BSA diente als Standard. Das Elutionsprofil der Immunaффinitätssäule wurde durch Messung der

Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Quantifizierung der aus Gelen eluierten Proteinmengen erfolgte durch Vergleich von densitometrisch (Beckmann DU - 8 Spectrophotometer) bestimmten Banden von Aliquoten der Eluate mit definierten Mengen an BSA, die zusammen auf ein analytisches Gel aufgetragen worden waren.

3.5. Reinigung von ChAT

Die Reinigung wurde bis einschließlich des Schrittes III nach Eckenstein et al. (1981) und der Immunmatrixschritt nach Eckenstein und Thoenen (1982) durchgeführt. Die gesamte Reinigung erfolgte bei 4°C im Kühlraum und unter Verwendung von gleichtemperierten Lösungen.

Vorreinigung

Schweinehirn stammte aus dem örtlichen Schlachthof, wo es nach Organentnahme auf Eis gelagert wurde. Auf einmal konnten 10 kg Hirn in Portionen zu je zwei Kilo mit drei Litern 0.1 M NaCl - Lösung in einem 5 Liter fassenden Becherglas unter Verwendung eines Ultra - Turrax zu einer dickflüssigen Suspension homogenisiert werden. Diese wurde dann bei 13 200 g für fünfzehn Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Sediments wurde der Überstand unter langsamen Rühren mit 1/3 des Gesamtvolumens 200 mM PMSF in Ethanol versetzt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Überstand mit dem halben Volumen an kaltem destilliertem Wasser verdünnt, in ein zwanzig Liter fassendes Becherglas gefüllt und unter langsamen Rühren mit 2 Liter CM - Sephadex - Suspension versetzt. Am Vortag war die CM - Suspension durch viermalige Zugabe von Puffer A äquilibriert worden. Der pH der Suspension aus Ionenaustauscher und verdünntem Überstand wurde mit 1 M HCl vorsichtig auf 5.7 eingestellt. Nach 15 minütigem, langsamen Rühren und anschließendem Absetzenlassen des Ionenaus-

tauschers, konnte man den Überstand absaugen. Nach viermaligem Waschen mit jeweils zehn Liter Puffer A war der Überstand klar. Dann konnte man die abgesetzte Ionenaustauschersuspension mit einem Viertel seines Volumens an 2 M NaCl enthaltendem, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5.7 versetzen und für fünfzehn Minuten langsam rühren lassen. Danach wurde die Suspension über einen Büchnertrichter abgesaugt und das Ionenaustauschermaterial solange mit der gleichen Lösung nachgewaschen, bis es nur noch schwach rosa gefärbt war. Die Färbung rührt von Hämoglobin her, das unter gleichen Bedingungen wie ChAT an den Ionenaustauscher bindet. Zum Regenerieren wurde der Ionenaustauscher in der Nutsche fünfmal mit je 3 Liter 0.5 M NaCl nachgewaschen, dann halbiert und jede Portion in einem Zehnliterbecherglas dreimal mit je fünf Liter destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Material darin im Kühlraum in 0.05% NaN_3 gelagert. Das Eluat versetzte man mit 400 g fein gepulvertem Ammoniumsulfat pro Liter und rührte weitere zwei Stunden. Danach wurde der Niederschlag bei 13 200 g und 4°C fünfzehn Minuten lang abzentrifugiert, in möglichst wenig TDG - Puffer resuspendiert und über Nacht gegen fünf Liter TDG - Puffer dialysiert.

Immunaффinitätschromatographie

Zur Immunaффinitätschromatographie wurden pro 10 kg Ausgangsmaterial Säulen zu je 5 ml Protein A - Sepharose - Suspension, das entspricht einer Aufschlammung von 1.5 g Trockensubstanz, verwendet. Die Anordnung bestand aus zwei hintereinandergeschalteten Säulen. Die vorgeschaltete Säule enthielt nur Protein A - Sepharose, um etwaige Antikörper im vorgereinigten Material zu binden. So wurde vermieden, daß diese auf der eigentlichen Trennsäule die dort nur adsorbierten, spezifischen Anti - ChAT - Antikörper verdrängen würden. Der verwendete monoklonale Antikörper wurde durch 50%ige Ammoniumsulfatfällung von Kulturüberständen vorgereinigt und angereichert. Zur Immunaффinitätschromatogra-

phie wurden zwei wie oben beschriebene Säulenarrordnungen verwendet. Diese waren mit jeweils einhundert Säulenvolumina Trispuffer voräquiliбриert worden. Dann wurden die nachgeschalteten Trennsäulen mit jeweils etwa 2.5 mg Antikörper enthaltendem, angereichertem Kulturüberstand, der mit Trispuffer auf 20 ml verdünnt worden war, mit 10 ml pro Stunde beladen. Danach wurde mit 10 ml Trispuffer bei gleicher Geschwindigkeit gewaschen. Dann konnte auf eine der beiden Säulenarrordnungen das auf pH 8.5 gebrachte Dialysat von 10 kg Ausgangsmaterial mit maximal 4 ml pro Stunde aufgetragen werden. Anschließend wurden diese mit 35 ml Trispuffer mit 10 ml pro Stunde gewaschen. Die andere Säulenarrordnung, die als Kontrollsäule diente, wurde mit 10 ml Trispuffer mit 10 ml pro Stunde gewaschen. Zur Elution wurden die Trennsäulen von den Vorsäulen entkoppelt und mit 0.2 M Natriumphosphatpuffer pH 5.5 mit 100 ml pro Stunde eluiert. 20 Fraktionen zu je 50 Tropfen wurden gesammelt. Die proteinenthaltenden Fraktionen der Kontrollsäule und die aktiven Fraktionen der ChAT - Reinigungssäule wurden gesammelt, auf pH 7.0 mit 1 N NaOH gebracht und für vierzig Stunden unter dreimaligem Wechseln der Lösung gegen 1 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Jedes Dialysat wurde in zwei 30 ml enthaltenden Falkonröhrchen aufgeteilt und gefriergetrocknet. Die Säulen wurden bei 10 ml pro Stunde mit etwa 100 Säulenvolumina 0.1 M Natriumacetat gewaschen. Der pH der Acetatlösung war mit 1 M HCl auf 3.0 eingestellt worden. Danach konnten die Säulen, wie bereits geschildert, äquiliбриert werden.

Präparative Gelelektrophorese

Präparative SDS - Polyacrylamidgele wurden nach Laemmli (1970), unter besonderer Berücksichtigung der Reinheitskriterien und sonstiger Vorsichtsmaßnahmen von Hunkapillar et al. (1983 b), durchgeführt. Alle Glas - und Plastikgefäße und Pipetten wurden vor Benützung mit Methanol und destilliertem Wasser ausgespült. Es wurden 3 mm dicke Gele mit

zehn Taschen gegossen und erst nach fünf bis sieben Tagen Lagerung bei 4°C verwendet. So wurde sichergestellt, daß die Matrix vollkommen auspolymerisiert war und möglichst wenig freie Radikale, die das aufzutrennende Protein modifizieren könnten, zurückgeblieben waren. Der Kathodenteil des Elektrophoresepuffers war noch zusätzlich 0.1 mM an Natriumthioglykolat, um etwaige restliche freie Radikale und andere Oxidationsmittel wegzufangen. Zum Auftragen des Immunmatrixeluates auf das Gel wurden jeweils der Inhalt eines Falconröhrchens, und zwar von der Kontroll- wie der ChAT - Reinigungssäule, in 150 µl Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Erhitzen auf 100°C wurde in Hinblick auf mögliche Proteinspaltung vermieden. Nach Entnahme eines Aliquots zur späteren Bestimmung der Elutionsausbeute, wurde der Inhalt eines Falconröhrchens in zwei Taschen aufgeteilt. Das Gel wurde bei 40 mA und Raumtemperatur gefahren. Die "Anfärbung" der Banden erfolgte nach Hager und Burgess (1980) durch fünfminütiges Schütteln des Gels bei 4°C in bidestilliertem Wasser, dann für fünf Minuten in 250 mM KCl und danach wieder für fünf Minuten in bidestilliertem Wasser. Die ChAT - enthaltende Bande und ein gleichgroßes Gelstück aus der gleichen Molekulargewichtsregion des Eluates der Kontrollsäule wurden mit einer Rasierklinge so herausgeschnitten, daß das Gelstück möglichst wenig beschädigt wurde und über Nacht bei 4°C in einem Eppendorfgefäß gelagert.

Elektrophoretische Elution

Am gleichen Tag wurde das Elutionssystem aufgebaut und mit bidestilliertem Wasser gefüllt, sodaß die Dialysemembranen nicht austrocknen und sich verziehen konnten. Diese wurden zuvor nach Hunkapillar et al. (1983 b) in einem Liter 1%igem NaHCO₃ für eine Stunde bei 60°C behandelt. Es wurde darauf geachtet, daß die Membranen zuvor auseinandergefaltet worden waren. Nach Spülen mit bidestilliertem Wasser wurden die Membranen für eine weitere Stunde in 0.1%iger SDS - Lösung

bei 60°C inkubiert. Danach wurden sie intensiv mit bidestilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C in 0.1% NaN_3 gelagert. Zur Durchführung der elektrophoretischen Elution wurden drei Liter bidestilliertes Wasser für zwei Stunden bei Raumtemperatur an der Wasserstrahlpumpe unter starkem Rühren entgast. Danach wurden 3 ml Triethylamin zugegeben und die Lösung in das Elutionssystem gefüllt. Beim Auffüllen der Elutionsröhrchen wurde darauf geachtet, daß keinerlei Blasen im gefüllten Röhrchen zurückblieben. Vorsichtig wurden darauf die Gelstücke in die Röhrchen gegeben und mit einer Dialysemembran oben verschlossen. Die Elution wurde unter konstanter Spannung von 300 Volt so durchgeführt, daß die Anfangsleistung drei Watt nicht überschritt. Nach maximal vierzehn Stunden wurde die Elution beendet, die Glasröhrchen von den blauen Gilson - Pipettenspitzen abgezogen und der Inhalt bei - 70°C gelagert. Zur Ausbeute - und Reinheitsbestimmung wurde nach 3.4. verfahren.

3.6. Reinigung der schweren Kette des monoklonalen Anti - ChAT - Antikörpers

Zur Reinigung der schweren Kette wurde ausgehend von einem Kontrollsäuleneluat wie für ChAT in 3.5. beschrieben weiterverfahren.

3.7. Analytische SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Durchführung erfolgte nach Laemmli (1970). Es wurden 1.5 mm dicke, 10%ige Acrylamidgele verwendet. Die Proben wurden vor Auftrag in Probenpuffer für zehn Minuten gekocht. Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom von 35 mA durchgeführt und die Gele mit "Coomassie brilliant blue" gefärbt. Zur Lagerung wurden die Gele unter Vakuum bei 65°C getrocknet.

3.8. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

0.5 µg Protein wurden in 500 µl fassenden Röhrchen von Abimed bei 159°C im Paraffinbad in zwanzig Minuten nach Tsugita und Scheffler (1982) in einer Mischung aus 12 M HCl (Fluka purissima), TFA (Pierce sequencing grade) und Phenol in der Gasphase nach Mewes (Max-Planck-Institut für Biochemie/Genzentrum, persönliche Mitteilung 1985) hydrolysiert. Danach wurden die Proben im Exsikkator getrocknet. Die getrockneten Proben wurden dann im automatischen Injektor von Abimed mit 20 µl OPA - Lösung (5 mg OPA, 5 ml 0.5M Boratpuffer (EGA Gold Label), pH 9.5, 5 ml Mercaptopropionsäure und 450 µl Methanol), nach etwa einer Minute mit 8 µl 0.5 M Ameisensäure und einer weiteren Minute mit 72 µl 12.5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0 versetzt. Danach wurden etwa 70% dieser Lösung auf die darangeschaltete Spherisorb ODS II (3 µ) - Säule nach Godel et al. (1984) aufgetragen und mit einem Gradienten von 0% A bis zu 70% B (A: 12.5 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0 und B : 50% Acetonitril (Merck LiChrosolv) und 50% A) chromatographiert. Gradientenmischer und Detektor stammten von LKB und der Schreiber mit Integrator von Hitachi.

3.9. Manuelle N - terminale Proteinflüssigphasensequenzierung

Es wurden die gleichen Reinheitsvorkehrungen wie in 3.5. für die präparative Gelelektrophorese und die eletrophoretische Elution getroffen. Die Sequenzierung wurde nach Chang (1983) durchgeführt (Zum Reaktionsmechanismus siehe Fig. 1). Dazu wurde die Proteinlösung in einem speziellen 150 µl fassenden Glasröhrchen lyophilisiert. Die Probe wurde dann in 10 µl Wasser unter starkem Durchmischen auf einem Vortex in Lösung gebracht, mit 10 µl Pyridin und mit 10 µl DABITC - Lösung (10 nmol/µl Pyridin) versetzt und unter Stickstoff, um Oxidation während der Umsetzung zu vermeiden, für fünfzig Minu-

ten bei 50°C umgesetzt. Danach wurden 2.5 µl PITC zugesetzt und bei gleicher Temperatur für zwanzig Minuten weiterreagieren gelassen. Anschließend erfolgte die Extraktion der Nebenprodukte. Dazu wurde fünfmal mit jeweils 50 µl 2:1 Heptan - Ethylacetat - Gemisch versetzt, stark durchmischt, zentrifugiert und die organische Phase verworfen. Die wäßrige Phase wurde zwei Stunden lang im Wasserstrahlvakuum getrocknet und danach für zehn Minuten und 50°C mit 12.5 µl absoluter TFA unter Stickstoff versetzt. Anschließend wurde die Probe etwa zwanzig Minuten wieder im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Danach erfolgte die Extraktion des Derivats der N - terminal abgespaltenen Aminosäure. Dazu wurde der Rückstand in 7.5 µl Wasser durch starkes "vortexen" gelöst und zweimal mit 12.5 µl Butylacetat versetzt. Nach Zentrifugation wurde die organische Phase gesammelt und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die wäßrige Phase konnte, wie eben bereits beschrieben, zur Abspaltung der nächsten Aminosäure umgesetzt werden. Die getrocknete, organische Phase wurde mit 30 µl 40% iger TFA für fünfzig Minuten bei 50°C unter Stickstoff umgesetzt. Nach Trocknen in zwei Stunden im Wasserstrahlvakuum wurde das Derivat in 2 µl absolutem Ethanol aufgenommen. Aliquots zu 0.1 bis 0.2 µl konnten in die Mitte einer 2 x 2 cm großen Polyacrylamiddünnschichtplatte aufgetragen und in zwei Dimensionen, und zwar in der ersten in 1:2 Essigsäure/Wasser und in der zweiten in 2:1:1 Toluol/n-Hexan/Essigsäure chromatographiert werden. Sichtbarmachung der Aminosäurederivate erfolgte im HCl - Dampf. Zur Unterscheidung von Leucin und Isoleucin wurde eine eindimensionale Polyacrylamiddünnschichtchromatographie in 100:3 Chloroform/Ethanol durchgeführt.

Die Derivate der Aminosäurestandards wurden nach Chang (1983) in folgender Weise hergestellt. 0.25 mg der entsprechenden Aminosäure wurden zusammen mit 50 µl Triethylaminpuffer (50 ml H₂O, 50 ml Aceton, 0.5 ml Triethylamin und 5 ml 0.2 M Essigsäure) pH 10.65 und 25 µl DABITC - Lösung (4 nmol DABITC/µl Aceton) bei 50°C für eine Stunde erhitzt

Über eine Spherisorb ODS II (3µ) - HPLC - Säule (Bischoff) unter isokratischen Bedingungen in 68.5% 30 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.0, 31% Acetonitril (Merck LiChrosolv) und 0.5% Dichlorethan (Merck LiChrosolv). Die Säule befand sich in einem Hewlett Packard 1090 Liquid Chromatograph - System das mit einem Shimadzu CR A - Schreiber und Integrator gekoppelt war.

3.11. Maschinelle Oligonukleotidsynthese

Das Oligonukleotid wurde mit einem 380 A DNA Synthesizer von Applied Biosystems nach Matteucci und Caruthers (1981) und unter Verwendung von nach Beaucage und Caruthers (1981) modifizierten Reagenzien durchgeführt. Die Ausbeuten wurden nach Fritz (Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, persönliche Mitteilung 1982) mit Hilfe der Tritylbestimmung in folgender Weise durchgeführt: ein Aliquot von 1 ml des entsprechenden Schrittes wurde mit Acetonitril auf 5 ml aufgefüllt. Davon wurden 77 µl entnommen, zu 1 ml 0.1 M Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat in Acetonitril gegeben und die Absorption bei 498 nm gemessen. Die Endausbeute für das Oligonukleotid ergab sich in folgender Weise. Der 498 nm - Wert des Syntheseschrittes mit der größten Extinktion wurde als 100% angesetzt und darauf der Wert für den letzten Schritt bezogen. Die repetitive Ausbeute konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\left(\frac{A_m}{A_n} \right)^{\frac{1}{n-n_m}} = X [\%]$$

A_m : maximaler Extinktionswert

A_n : Extinktionswert des letzten Syntheseschrittes

X : Repetitive Ausbeute; n : Anzahl der Schritte

n_m : Schritt mit maximalem Extinktionswert

3.12. Herstellung der Molekulargewichtsmarker für die Reinigung des Oligonukleotids

Die Molekulargewichtsmarker wurden aus der Polylinkerregion des SP 64 - Plasmids geschnitten. Dazu wurden 30 µg in 30 µl Wasser mit 10 µl Hind III, das entspricht 220 Einheiten, in 6 µl Hind - Puffer und 24 µl Wasser in zwei Stunden bei 37°C gespalten. Danach erfolgte Fällung mit einem Zehntel des Volumens 2 M Natriumacetat und drei Volumen Ethanol für eine Stunde auf Trockeneis. Der bei 12 000 g abzentrifugierte Niederschlag wurde in 30 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und jeweils 10 µl davon für jede weitere Reaktion verwendet. Zu jeder Probe wurden jeweils 2 µl 10xPuffer (für die Bam HI - und die EcoRI Reaktion wurde der Hind - Puffer und für die SmaI - Reaktion wurde der Sma - Puffer eingesetzt); 2 µl Enzym (das entspricht 20 Einheiten BamHI, 140 Einheiten EcoRI und 32 Einheiten SmaI) und 4 µl bidestilliertes Wasser und 24 Einheiten alkalischer Phosphatase zugegeben und bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. Die Phosphatase wurde zur Dephosphorylierung der neugeschaffenen 5' - Enden verwendet, um diese anschließend ³²P - markieren zu können. Nach Zugabe von jeweils 18 µl bidestilliertem Wasser und 2 µl STE - Puffer wurde bei 68°C, um die Phosphatase zu inaktivieren, für weitere fünfundzwanzig Minuten inkubiert. Anschließend wurden eine Extraktion mit gleichem Volumen an wassergesättigtem Phenol und zwei Extraktionen mit Chloroform durchgeführt. Die Marker wurden mit einem Viertel des Volumens 8M Ammoniumacetat und drei Volumen Ethanol in einer halben Stunde auf Trockeneis gefällt. Der Niederschlag konnte in bidestilliertem Wasser aufgenommen und ³²P - endmarkiert werden.

3.13. Reinigung des Oligonukleotids

Das Oligonukleotid wurde nach Maxam und Gilbert (1980) über ein 20 x 40 cm großes, 1.5 mm starkes, 8%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel gereinigt. Die Glasplatten des Gels wurden nach der Vorschrift im LKB - Handbuch (Instruction Manual LKB 2010 Macrophor Electrophoresis Unit) silanisiert. Zum Gießen des Gels wurden 26.6 ml einer 28.5%igen Acrylamidlösung, die noch 1.5% Bisacrylamid enthält, 50 g elektrophoresereinen Harnstoffs und 10 ml Puffer (1 M Tris, 1 M Borat und 20 mM EDTA, mit NaOH auf pH 8.3 eingestellt) mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde unter leichtem Erhitzen gerührt, filtriert und für eine halbe Stunde am Wasserstrahlvakuum entgast. Nach Zugabe von 25 µl TEMED und 700 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung, wurde das Gel gegossen. Ein Viertel der Gesamtmenge an synthetisiertem Oligonukleotid wurde dreimal mit gleichem Volumen Ether extrahiert und mit 5 µg tRNA und etwa 100 000 cpm ^{32}P - endmarkiertem Oligonukleotid versetzt. Diese Lösung wurde mit einem Viertel des Volumens 8M Ammoniumacetatlösung und dem dreifachen Volumen 4°C kaltem Ethanol in zwei Stunden auf Trockeneis gefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10°C und 12 000 g wurde der Niederschlag mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, wieder in gleicher Weise zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag von restlichem Ethanol durch kurzes Lyophilisieren befreit. Zur Gelelektrophorese wurde der Niederschlag in 50 µl 98%igem, rekristallisiertem Formamid und der Marker in 25 µl des gleichen Lösungsmittels aufgenommen, fünf Minuten auf 100°C im Wasserbad erhitzt und zehn Minuten auf Eis gelagert. Danach konnten der Marker, das Oligonukleotid in zwei Taschen und die Farbmarkerlösung (80% Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% Xylencyanol und 0.1 % Bromphenolblau) auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200 Volt in neunzehn Stunden durchgeführt. Danach wurde in zwei Stunden bei - 70°C eine Autoradiographie zur Lokalisierung der

Banden durchgeführt. Damit und durch Nachweis der Banden bei 254 nm konnten diese aus dem Gel herausgeschnitten werden. Jede der Banden wurde in ein 2.5ml fassendes Eppendorfgefäß gegeben; in 1 ml 500 mM Ammoniumacetat, 1 mM EDTA und 0.1% SDS mit Hilfe eines Spritzenstempels zerkleinert und achzehn Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Gelmatrix abzentrifugiert und der Überstand durch eine Spritze mit Filter gedrückt. Die Matrix wurde nochmals unter gleichen Bedingungen sechs bis acht Stunden inkubiert, der Überstand wie zuvor behandelt und mit dem ersten vereinigt. Es folgte dreimalige Extraktion mit dem gleichen Volumen einer Mischung von 25:24:1 Teilen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zweimal mit gleichem Volumen Ether. Der Rest des Ethers wurde durch Lyophilisieren entfernt. Durch Zugabe von einem Viertel des Volumens 8M Ammoniumacetatlösung und dem dreifachen Volumen Ethanol wurde das eluierte Oligonukleotid in zwei Stunden auf Trockeneis gefüllt. Der zentrifugierte Niederschlag wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Messung der Absorption eines Aliquots bei einer Wellenlänge von 260 nm ergab 350 µg Oligonukleotid (28 nmol).

3.14. ³²P - Endmarkierung von Oligonukleotiden

Zur Markierung am 5' - Ende nach Maxam und Gilbert (1980) wurden 25 ng Oligo - dT - Nukleotide(12-18) oder 50 ng CAT/L1 - Oligonukleotid in 1 µl bidestilliertem Wasser mit 15 µl Triskinasepuffer, 1 µl T4 - Polynukleotidkinase (9000 Einheiten pro ml) und 5 µl [γ -³²P] - ATP (25 µCi/17.5 pmol) bei 37°C im Wasserbad in dreißig Minuten umgesetzt. Die Reaktion wurde in fünf Minuten bei 95°C abgestoppt. Das markierte Oligonukleotid wurde von den restlichen Reaktionsbestandteilen durch Sephadex G 50 - Gelfiltration in einer fast bis zum Rand gefüllten Pasteurpipette abgetrennt. Das Säulenmaterial, das bei 4°C in bidestilliertem Wasser aufbewahrt wurde, wurde vor Benützung zweimal mit 10 mM

Triethylaminhydrogencarbonatpuffer, pH 7.2; gewaschen. Nachdem das Reaktionsprodukt auf die Säule gegeben worden war, wurde mit dem gleichen Puffer in 100 μ l Schritten eluiert. In den ersten aktiven Fraktionen befand sich das markierte Oligo - dT - Nukleotid mit einer spezifischen Aktivität von 10^6 cpm/ng und das Oligonukleotid CAT/L1 von $0.8 - 1.8 \times 10^6$ cpm/ng in den letzten der Überschuß an nicht umgesetztem [γ - 32 P] - ATP.

3.15. Isolierung von Gesamt - RNA

Um RNasenkontamination zu vermeiden wurden bei Arbeiten mit RNA alle Puffer DEP - behandelt, das heißt mit 0.2% DEP für dreißig Minuten gerührt, dann für eine Stunde auf etwa 100°C erhitzt. Falls dies auf Grund chemischer Reaktionen nicht möglich war, wurden die Puffer in zweimal destilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Glaswaren wurden wie Plastik, falls nicht steril erhältlich, hitzesterilisiert. Gesamt - RNA wurde nach einer von Heumann et al. (1984) modifizierten Methode nach Melera und Rusch (1973) isoliert. Das dazu verwendete Phenol wurde bei 182°C destilliert. Das Destillat wurde mit 0.1% des Endvolumens Hydroxychinolin versetzt und dreimal mit gleichem Volumen 1 M Tris/HCl - Puffer pH 8.0 und dreimal mit 0.1 M Tris/HCl - Puffer pH 8.0; 0.2% Mercaptoethanol enthaltend, ausgeschüttelt. Die benötigte Bentonitlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 2 g Bentonit wurden in 40 ml bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt; 20 Minuten mit 0.2% DEP gerührt, 35 Minuten gekocht und 15 Minuten bei 13 200 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Rest nochmals bei 13 200 g für zwanzig Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 0.1 M EDTA resuspendiert und für achtundvierzig Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde diese Suspension wie bereits geschildert zentrifugiert, der Niederschlag in 10 mM Natriumacetat pH 6.0 gelöst und zwanzig Minuten bei 13 200 g zentrifugiert. An Hand des Naß-

gewichts des neuen Niederschlags wurde eine 4%ige Lösung im selben Puffer erstellt.

Zur Isolierung von Gesamt - RNA wurden 10 ml Phenol und 10 ml Melera A - Puffer in einem 50 ml Falconröhrchen durchmischt und auf Eis gestellt. Ebenso wurde der 30 ml Glas - Teflon - Pottereinsatz auf Eis vorgekühlt. 2g an Gewebe wurden in einer mit Ethanol ausgespülten Reibschale in flüssigem Stickstoff zerrieben und zusammen mit dem Inhalt des Falconröhrchens bei 1000 Umdrehungen homogenisiert und in 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen bei 5°C in zehn Minuten bei 16 300 g zentrifugiert. Die obere Phase davon wurde auf Eis gelagert; die untere mit dem gleichen Volumen an Melera B versetzt, zwanzig Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend in gleicher Weise zentrifugiert. Die obere Phase davon wurde wieder mit der oberen Phase des vorangegangenen Schrittes vereint. Die untere Phase wurde für fünfzehn Minuten mit dem gleichen Volumen an Melera C bei 45°C geschüttelt und wieder in gleicher Weise zentrifugiert. Wieder wurde die Obere abgenommen und zusammen mit den restlichen oberen Phasen mit gleichem Volumen Phenol versetzt, für zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und wie üblich zentrifugiert. Die obere Phase davon wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen an 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol für zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und in gleicher Weise zentrifugiert. Nochmals wurde davon die obere Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Die RNA wurde aus der wäßrigen Phase mit einem Zehntel des Volumens 10 M LiCl und dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt. Die fadenförmige DNA wurde mit Hilfe eines Glasstabes entfernt und die RNA bei - 70°C gelagert. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Aliquot bei 0°C und 16 300 g zentrifugiert; in bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

3.16. Isolierung von Poly(A)⁺mRNA

Zum RNasefreien Arbeiten wurden die gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie in 3.15 eingehalten. Die Isolierung erfolgte durch Oligo - dT - Zellulosechromatographie nach Aviv und Leder (1972). Säulenmaterial wurde in bidestilliertem Wasser aufgeschlämmt und eine Pasteurpipette bis etwa 1 cm unter den Rand vollgefüllt. Einen Tag vor Benutzung der Säule wurde diese mit 50 ml E - Puffer gewaschen und über Nacht bei 4°C in diesem Puffer gelagert. Am nächsten Tag wurde die Säule vor Benutzung nochmals mit zwei Säulenvolumina E - Puffer gewaschen und dann mit drei oder mehr Säulenvolumina an B - Puffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurde die RNA von 2 bis 3g Ausgangsmaterial enthaltende Lösung aufgetaut und bei 0°C und 16 300 g dreißig Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nach Verwerfen des Überstandes unter Stickstoff getrocknet und in maximal 2 ml DEP - Wasser aufgenommen. Mit einem Aliquot davon wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die Menge an RNA bestimmt, da auf die Säule nicht mehr als 2 bis 3 mg RNA aufgetragen werden sollten. Die restliche RNA - Lösung wurde mit 5 M NaCl und 10%iger SDS - Lösung auf die dem B - Puffer entsprechende Endkonzentration eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Darauf wurde zuerst mit einigen 100 µl an B - Puffer nachgewaschen, schließlich solange B - Puffer bei einer Geschwindigkeit von drei bis vier Tropfen pro Minute nachgegeben, bis die in Teilen zu einhundert Tropfen gesammelten Fraktionen einen Wert unter 0.05 bei einer Wellenlänge von 260 nm aufwiesen. Diese wurden gesammelt, mit einem Zehntel des Volumens 2 M Natriumacetat und drei Volumen Ethanol gefällt und als Poly(A)⁺mRNA bei - 70°C gelagert. Die Säule wurde danach solange mit I - Puffer bei einer Geschwindigkeit von fünf Tropfen pro Minute gewaschen bis der 260 nm Wert der eluierten Fraktionen wieder unter 0.05 lag. Danach wurde mit E - Puffer bei einer Geschwindigkeit von zwei bis drei Tropfen pro Minute die Säule eluiert und Fraktionen zu dreißig Tropfen in siliconisierten

Eppendorfgefäßen gesammelt. Es wurden zehn Fraktionen genommen, bei 260 nm gemessen, die RNA enthaltenden gesammelt und mit einem Zehntel des Volumens 2 M Natriumacetat und drei Volumen Ethanol gefällt. Falls es weniger als 50 µg RNA waren, wurde noch soviel tRNA zugegeben, bis eine Gesamtmenge von 50 µg RNA erreicht war. Lagerung der RNA erfolgte bei - 70°C.

3.17. Agarosegelelektrophorese von denaturierter RNA

Die Elektrophorese erfolgte nach Thomas (1980). RNA wurde bei 0°C aufgetaut und bei gleicher Temperatur für dreißig Minuten bei 12 000 g zentrifugiert. Zum Abtrennen von restlicher DNA und Protein wurde der Überstand verworfen und der RNA - Niederschlag nach Tullis und Rubin (1980) weiterbehandelt. Bis zu 40 µg RNA wurden in 100 µl DEP - Wasser aufgenommen, mit 10 µl 100 mM CaCl₂ und 200 mM Tris/HCl pH 7.5 und 20 µl DNase I/Proteinase K - Lösung versetzt. Es folgte Inkubation der Lösung bei 37°C für 30 Minuten. Danach wurde zu dieser Lösung noch 6 µl 0.5 M EDTA und 13 µl 10%ige SDS - Lösung gegeben und für weitere 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 50 µl 8M Natriumacetat und 450 µl Ethanol für zwei Stunden auf Trockeneis gefällt. In der Zwischenzeit wurde eine Gelkammer für 20 x 20 cm messende, horizontale Gele für eine Stunde mit 0.1 M NaOH zur Zerstörung von RNasen versetzt und anschließend mit bidestilliertem Wasser ausgespült. Zum Gießen des Gels wurden 1 g ultrareine Agarose in 10 ml 100 mM Natriumdihydrogencarbonat pH 7.0 gelöst, mit DEP - Wasser auf 100 ml Endvolumen aufgefüllt und auf der Heizplatte solange gerührt, bis die Lösung klar wurde. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 50°C konnte das Gel in die vorbereitete Kammer gegossen werden. Nach etwa einer halben Stunde war die Matrix polymerisiert und konnte mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0 versetzt werden. Die behandelte und gefällte RNA wurde dann bei 0°C und 12 000 g für dreißig Minuten abzentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in 5 µl DEP - Wasser aufgenommen, mit 15 µl Glyoxylierungslösung versetzt und dreißig Minuten bei 50°C inkubiert. Nach fünf Minuten auf Eis wurde die Probe mit 5 µl Stopplösung (0.4% Bromphenolblau, 50% Glyzerin und 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0) versetzt. Ein Maximum von 20 µl davon wurde pro Tasche auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 10 Volt in zwölf bis sechszehn Stunden durchgeführt. Die Glyoxylierungslösung bestand aus 22 µl 6 M Glyoxallösung, 65 µl Dimethylsulfoxid und 13 µl 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0. Die verwendete Glyoxallösung wurde in folgender Weise vor Gebrauch deionisiert. 6 ml Lösung wurden mit 3g Ag501x8 versetzt, für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, danach durch einen Sterilfilter filtriert und portioniert bei - 20°C gelagert.

3.18. Übertragen der RNA von Agarosegelen auf Nitrozellulose

Übertragung der RNA erfolgte nach Thomas (1980) (Fig. 2). Ein der Größe des Gels entsprechendes Stück Nitrozellulose wurde zugeschnitten, zehn Minuten in DEP - Wasser und weitere zwanzig Minuten in 20xSSC inkubiert und anschließend auf das Gel gelegt. Das Kleenexpapier wurde tagsüber alle zwei Stunden gewechselt. Der Transfer wurde in maximal vierundzwanzig Stunden durchgeführt. Danach wurde die Nitrozellulose locker in Alufolie eingewickelt, dreißig Minuten bei Raumtemperatur vorgetrocknet, weitere dreißig Minuten im Ölpumpenvakuum und anschließend vier Stunden in diesem Vakuum bei 75°C getrocknet. Wurde die Nitrozellulose nicht gleich weiterverarbeitet, konnte sie im Vakuum aufbewahrt werden.

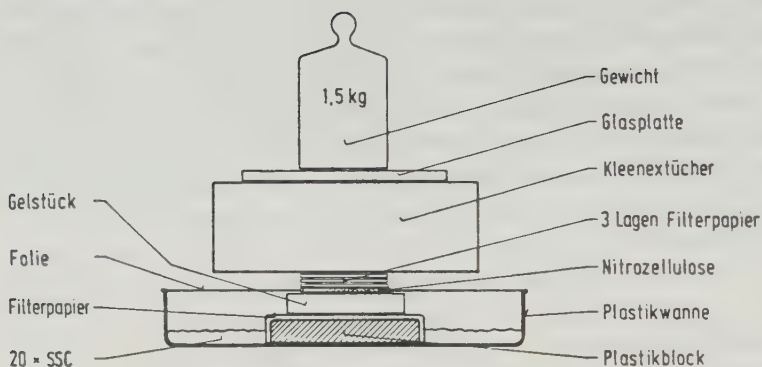


Fig. 2 Übertragungsweise von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose

3.19. Hybridisierung

Nach Thomas (1980) wurde die getrocknete Nitrozellulose für zehn Minuten in 20xSSC inkubiert, auf Kleenextüchern getrocknet und mit Vorhybridisierungslösung so in Plastikfolie eingeschweißt, daß möglichst wenig Luftblasen in der Folie zurückblieben. Bei der nach 4.3.2. berechneten Temperatur wurde die Vorhybridisierung fünfeinhalb Stunden lang durchgeführt. Danach wurde bei gleicher Temperatur mit 3 - 5 ml Hybridisierungslösung, die 30 - 50 ng ^{32}P - markiertes Oligonukleotid mit einer spezifischen Aktivität von $0.8 - 1.8 \times 10^6$ cpm/ng enthielt, für fünfundzwanzigeinhalb Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung verworfen, die Nitrozellulose dreimal bei Raumtemperatur in 2xSSC und 0.1% SDS gewaschen und schließlich bei vorberechneten Salzkonzentrationen und Temperaturen weitergewaschen. Zur Überprüfung von Signal - Rauschverhältnissen und zur Sichtbarmachung eventueller Banden wurden zu entsprechenden Zeitpunkten Autoradiographien angefertigt. Dazu wurde die

Nitrozellulose an der Luft getrocknet und in eine Folie eingeschweißt. Zur laserdensitometrischen Auswertung der Autoradiographien wurde ein LKB 2202 Ultroscan Laser Densitometer gekoppelt mit einem LKB 2220 Recording Integrator verwendet.

3.20. "Dotblots"

"Dotblots" wurden nach Heumann et al. (1984) auf der Grundlage von White und Bancroft (1982) durchgeführt. Dazu wurde die Poly(A)⁺mRNA und Poly(A)⁻RNA, wie bereits unter 3.17. beschrieben, mit DNase vorbehandelt und gefällt. 1 µg dieser RNA wurde in 10 µl DEP - Wasser aufgenommen, mit 10 µl 20xSSC und 80 µl 10xSSC versetzt. Davon wurden 50 µl als erster Wert mit Hilfe einer Saugvorrichtung auf die Nitrozellulose unter leichtem Ansaugen mit der Wasserstrahlpumpe aufgetragen. Die Nitrozellulose war zuvor zehn Minuten in DEP - Wasser und dann zwanzig Minuten in 20xSSC eingelegt worden. Für die weiteren Werte wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe mit 10xSSC durchgeführt. Die Proben wurden in gleicher Weise auf die Nitrozellulose aufgetragen, mit 50 µl 10xSSC nachgewaschen, bei Raumtemperatur für dreißig Minuten vorge-trocknet und dann wie in 3.18. weiterbehandelt. Hybridisierung erfolgte mit 25 ng ³²P - endmarkiertem Oligo - dT - Nukleotid (12-18) mit einer spezifischen Aktivität von 10⁶ cpm/ng in 3 ml Hybridisierungslösung für vierundzwanzig Stunden nach fünf Stunden Vorhybridisierung.

4. ERGEBNISSE

4.1. Reinigung von ChAT

4.1.1. Allgemeine Reinigungsdaten

Die ersten drei Reinigungsschritte der ursprünglichen Prozedur von Eckenstein et al. (1981) wurden beibehalten. An Stelle der dort folgenden weiteren drei Säulenchromatographieschritte wurde eine nichtkovalente Immunaффinitätschromatographie nach Eckenstein und Thoenen (1982) durchgeführt. Der davon eluierte Antikörper - ChAT - Komplex konnte auf einem präparativen SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Das Enzym wurde aus dem entsprechenden Gelstück in einem speziell dafür entwickelten System unter elektrophoretischen Bedingungen herauseluiert (Fig. 3).

Auf Entwicklung und Ergebnisse der letzten beiden Reinigungsschritte wird im folgenden Kapitel eingegangen werden.

Nach sechs Reinigungsschritten konnten ausgehend von 10 kg Schweinehirn 66 µg ChAT in sequenzierfähiger Form erhalten werden. Dieses Material zeigte, wie bereits von Eckenstein et al. (1981) beschrieben wurde, auf einem SDS - Polyacrylamidgel eine Bande in der Molekulargewichtsregion von 68 kdal. Da ChAT nach der elektrophoretischen Elution nicht mehr enzymatisch aktiv war, wurde eine theoretische spezifische Aktivität von 59 339 Einheiten/mg Protein berechnet. Die theoretisch bestimmte Ausbeute betrug 6% (Tab. 1; Fig. 4).

Tab. 1 Ergebnisse einer Reinigung, ausgehend von 10 kg Schweinehirn

SCHRITT	VOLUMEN (ML)	AKTIVITÄT (EINHEITEN) ¹⁾	PROTEIN (MG)	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (EINHEITEN·MG ⁻¹)	REINIGUNGS- FAKTOR	AUSBEUTE (%)
HOMOGENAT	17 500	65 600	1 100 100	0.059	1	100
I ÜBERSTAND NACH ZENTRIFUGATION	7 500	46 875	187 500	0.25	4.2	71.4
II CM-SEPHADEX- ELUAT	11 500	43 125	33 700	1.28	21.7	65.7
III DIALYSAT DER (NH ₄) ₂ SO ₄ -FÄLLUNG	325	17 875	2 375	7.53	127.6	27.3
IV ELUAT DER MAB- PROTEIN A-SEPHAROSE- CHROMATOGRAPHIE	12	10 500	1.25	8 400.00	140 000.0	16.0
V GELELUAT VI	0.76	3 916 ²⁾	0.066	59 339.00 ²⁾	1 005 747.0 ²⁾	6.0 ²⁾

1) Eine Einheit entspricht der Bildung von 1 nmol [1 - ¹⁴C] - Acetylcholin pro Minute bei 37°C.

2) Da ChAT nach der Elution aus dem Gel nicht mehr enzymatisch aktiv war, wurde der Wert auf Protein Basis berechnet, wobei davon ausgegangen wurde, daß 38% des Proteins von Schritt IV ChAT sind.

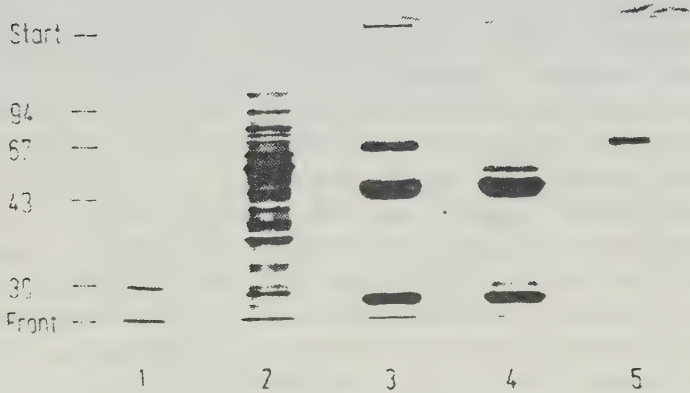


Fig. 4 SDS - Polyacrylamidgel wesentlicher Reinigungsschritte

Es wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen nach 3.7. gefahren und gefärbt.

1) Molekulargewichtsmarker: Phosphorylase b (94kda), BSA (67kda), Ovalbumin (43kda) und Carbonische Anhydrase B (30kda)

2) Dialysiertes ammoniumsulfatgefälltes CM - Sephadex - Eluat (etwa 30 µg Protein)

3) mAB - Protein A - Sepharose - Eluat der ChAT - Reinigungssäule (etwa 30 µg Protein)

4) mAB - Protein A - Sepharose - Eluat der Kontrollsäule (etwa 25 µg Protein)

5) elektrophoretisch eluierte ChAT (3.4 µg Protein)

4.1.2. Entwicklung und Anwendung des Elektroelutionssystems

Das verwendete präparative Gelsystem mit anschließender elektrophoretischer Elution von ChAT aus dem entsprechenden Gelstück ermöglichte in technisch einfacher Weise die direkte Sequenzierung des erhaltenen Materials ohne Abtrennung störender Substanzen wie SDS, "Coomassie brilliant blue" oder Puffersalzen. Dies ist, wie im Fall von ChAT, von erheblicher Bedeutung, wenn SDS mit Hilfe üblicher Methoden nicht quantitativ genug abtrennbar ist, sodaß eine anschließende Sequenzierung nicht möglich ist. Dies ist auch dann wesentlich, wenn die Abtrennung störender Substanzen als weiterer Reinigungsschritt die Ausbeute an zu isolierendem Protein noch weiterhin vermindern würde.

Zur Auftrennung des von der Protein A - Sepharose eluierten Antikörper - ChAT - Komplexes wurde ein präparatives SDS - Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Fällung des Protein - SDS - Komplexes nach Hager und Burgess (1980) mit KCl sichtbar gemacht. Die Bande von ChAT konnte herausgeschnitten, und das Protein in der in Figur 5 dargestellten Apparatur daraus eluiert werden. Das zu Grunde liegende Prinzip besteht darin, daß Proteine mit einem isoelektrischen Punkt kleiner als dem pH der Elutionslösung bei Anlegung der Spannung aus dem Gelstück als Anionen auf dem unteren Dialyseschlauch angereichert werden. Der pH von 10 - 12 wurde durch 7mM Triethylamin erreicht. Dadurch wurde nach Lyophilisierung der eluierten Probe die unmittelbar anschließende proteinchemische Charakterisierung möglich.

Damit die technisch einwandfreie Durchführung der Elution gewährleistet war, mußte die Elutionslösung vor der Zugabe von Triethylamin vollständig entgast sein. Eine Zeitdauer von zwei Stunden bei vollem Wasserstrahlvakuum war ausreichend. Obwohl die Elution bei 4°C durchgeführt wurde, wurde zimmertemperiertes Wasser entgast, um ein Minimum an gelösten Gasen zu erreichen. Im weiteren durfte die

Anfangsleistung im System den Grenzwert von 3 Watt Leistung nicht überschreiten, da sonst zuviel Wärme in den Elutionsröhrchen erzeugt wurde. Dies hatte die Freisetzung von Luft - oder Triethylaminblasen zur Folge. Eine Weiterelution war dann durch mechanische Blockierung und Unterbrechen des elektrischen Feldes durch Blasenbildung nicht mehr möglich.

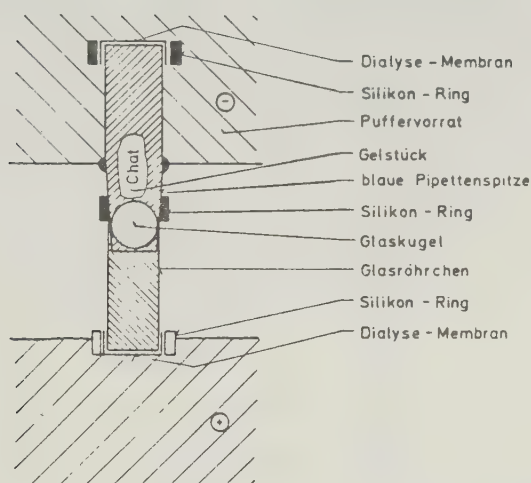


Fig. 5 Elutionsapparatur

Um Anhaltspunkte über die Ausbeute der Elution in Abhängigkeit von der Zeit zu gewinnen, wurden mit Hilfe von BSA die in Figur 6 dargestellten Daten ermittelt. BSA wurde wegen des nahezu gleichen Molekulargewichts von 67 kdal im Vergleich zu ChAT von 68 kdal und des isoelektrischen Punktes von 4.9 gewählt. Auf Grund der Bindung von ChAT an

CM - Sephadex bei pH 5.7 ist zu folgern, daß es sich ebenfalls um ein saures Protein handelt.

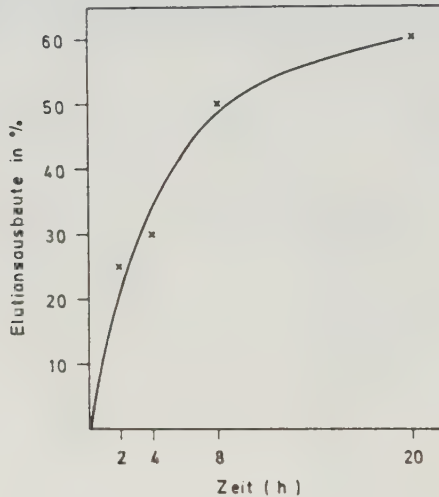


Fig. 6 Ausbeute an BSA in Abhängigkeit von der Elutionsdauer

Zur Bestimmung der Elutionsausbeute wurde nach 3.5. ein präparatives Gel mit jeweils 100 µg BSA pro Tasche gefahren, eine Bande pro Elutionsröhrchen verwendet und die Ausbeuten durch Entnahme der Eluate nach den entsprechenden Zeitintervallen nach 3.4. ermittelt.

Im Fall von ChAT reichte eine Elutionszeit von 14 Stunden aus, da nach weiteren 5 - 9 Stunden keine Steigerung der Ausbeute eintrat. Im weiteren war die Elutionsausbeute von der Färbemethode des Gels abhängig. Proteine konnten durch Fällung von freiem SDS in der Gelmatrix durch hohe Konzentration an Natriumacetat nach Higgins und Dahmus (1979) oder durch Fällung des Protein - SDS - Komplexes mit KCl nach Hager und Burgess (1980) sichtbar gemacht werden. Im ersten Fall wurde die Ausbeute um einen Faktor Drei vermindert. Letztlich war auch die Menge an ChAT, die auf das präparative Gel aufgetragen wurde für die Ausbeute an freiem

N - Terminus, der zur Sequenzierung zur Verfügung stand, von Bedeutung. Verminderung der Auftragsmenge um einen Faktor Sieben reduzierte die Menge an freiem N - Terminus um die Hälfte. Mit dem so entwickelten Elutionssystem konnte eine durchschnittliche Ausbeute von $38 \pm 9\%$ erhalten werden (Tab. 2).

Tab. 2 Ausbeute und Reinheitsgrad von 12 Elutionen

Elution	Ausbeute (%)	Reinheitsgrad (%)

1	50	100
2	30	97
3	30	97
4	25	90
5	40	94
6	60	87
7	35	83
8	28	96
9	30	86
10	36	88
11	41	91
12	50	88

Die so gewonnene Enzympräparation war durchschnittlich 91% rein (Tab. 2). Das heißt, daß eine SDS - Polyacrylamidgelanalyse des Proteinmusters neben der ChAT - Bande eine Proteinkontaminante in der Molekulargewichtsregion der schweren Kette des Antikörpers zeigte. Eine molekulare Charakterisierung dieser Kontaminanten erfolgt in 4.2.2.. In 5.3. wird diskutiert, inwieweit ihr Anteil an der Enzympräparation vermindert werden kann und in welcher Weise sich dies auf die Sequenzierbarkeit von ChAT auswirkt.

An Hand der in Tabelle 3 aufgeführten Proteine wurde untersucht, inwieweit die hier für ein spezielles Protein entwickelte Elutionstechnik generell auch für andere Proteine anwendbar ist. Aus dem Vergleich der Daten für Phosphorylase b, BSA und Myoglobin folgt eine deutliche Abhängigkeit der Elutionsausbeute vom Molekulargewicht und für BSA und GAPDH eine solche für den isoelektrischen Punkt (Tab. 3). Das heißt, daß das beschriebene System nur zur Elution bestimmter Proteinklassen geeignet ist.

Tab. 3 Elutionsausbeuten der Testproteine

Protein	Molekulargewicht ²⁾ (kdal)	Isoelektrischer Punkt ²⁾	Ausbeute ¹⁾ (%)
Phosphorylase b (Kaninchenmuskeln)	94	6.1/6.3	1
BSA (Rinder - serum)	67	4.9	48
GAPDH (Rind)	36	8.3/8.5	20
Myoglobin (Pferd)	17	6.5-7.8	56

1) Es wurde nach 3.5. ein präparatives, 15%iges Polyacrylamidgel mit jeweils 50 µg Protein pro Bande gefahren und die Proteine daraus eluiert. Die Ausbeuten wurden, genau wie in der Legende zu Tabelle 2 beschrieben, bestimmt.

2) Die Werte für die Isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte von BSA, GAD und Myoglobin stammten von Righetti und Caravaggio (1976) und für Phosphorylase b von Bernd (Diabetesforschungsinstitut der Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung 1985).

4.2. Molekulare Charakterisierung von ChAT

4.2.1. Aminosäurezusammensetzung

Da mineralische Säuren hydrophobe Peptidbindungen nicht vollständig hydrolysieren, wurde nach Tsugita und Scheffler (1982) eine Mischung aus TFA und Hydrochlorsäure verwendet. Diese Methode besitzt den zusätzlichen Vorteil, daß die üblichen Hydrolysezeiten von 24 Stunden und mehr auf 20 bis 40 Minuten reduziert werden können. Tryptophan wird wie bei den anderen konventionellen Methoden zerstört. Zum Nachweis der einzelnen Aminosäuren wurden diese nach Godel et al. (1984) nach erfolgter Hydrolyse mit einem Gemisch aus OPA und 2 - Mercaptopropionsäure derivatisiert und mittels HPLC aufgetrennt und fluorometrisch nachgewiesen (Fig. 7). Vorteile gegenüber der konventionellen Ninhydrinmethode sind erhöhte Sensitivität und Schnelligkeit.

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (Tab. 4) wurden drei voneinander unabhängige Hydrolysen mit jeweils 0.5 µg an ChAT (7 pmol) durchgeführt. Dazu wurde die gleiche Präparation wie zur Bestimmung der N - terminalen Sequenz verwendet. Als Leerwert diente ein gleichgroßes Volumen eines Eluats aus einem Gelstück der gleichen Molekulargewichtsregion wie ChAT. Dazu war auf das Gel das Eluat der Kontrollimmunsäule aufgetragen worden.

Da das Nachweisreagenz nur mit primären Aminogruppen reagiert, konnte Prolin nicht bestimmt werden. Cystein war nicht quantifizierbar.

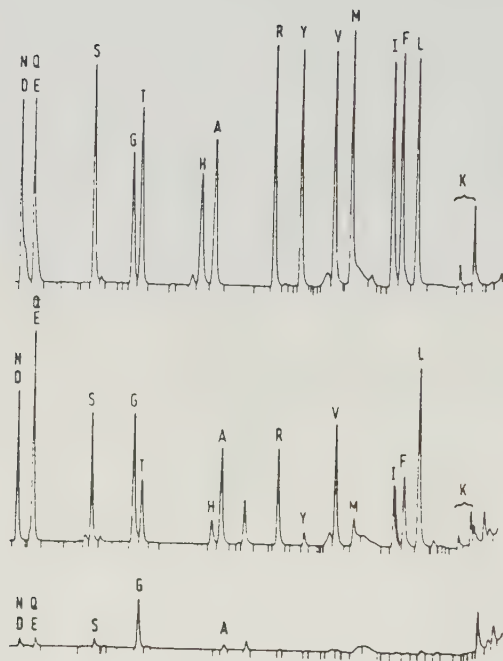


Fig. 7 Chromatogramme der derivatisierten Hydrolyseprodukte

Hydrolysen und anschließende chromatographische Auftrennungen wurden nach 3.8. durchgeführt. Die abgebildeten Chromatogramme zeigen von oben nach unten eine Standardmischung und die Derivate der Hydrolyseprodukte von ChAT und dem Leerwert.

Tab. 4 Aminosäurezusammensetzung von ChAT

Aminosäure	pmol - Werte ¹⁾		Zusammensetzung		Zusammensetzung (korrigierte) ⁴⁾
	Probe	Leerwert	relative ²⁾	absolute ³⁾	
Asx	135.5	3.2	1.29+0.04	54	53
Glx	182.5	4.2	1.73+0.03	72	70
Ser	99.2	3.1	0.94+0.06	39	38
Gly	113.2	34.1	1.08+0.04	45	31
Thr	68.7		0.65+0.06	27	27
His	37.3		0.35+0.03	15	15
Ala	105.2	3.0	1	42	41
Arg	91.3		0.87+0.01	36	36
Tyr	26.2		0.24+0.12	10	10
Val	97.6		0.93+0.03	39	39
Met	16.5		0.15+0.09	6	6
Ile	56.5		0.54+0.03	22	22
Phe	61.0		0.58+0.04	24	24
Leu	153.8		1.46+0.04	61	61
Lys	104.0		0.99+0.01	41	41

1) Durch Flächenvergleich der Absorptionen der Aminosäurederivate der Probe und des Leerwertes mit denen der Standardmischung konnten die pmol - Werte berechnet werden (Angabe der Mittelwerte; für die Probe auf 0.5 µg ChAT bezogen).

2) Durch Bezug auf Alanin als internen Standard wurden die relativen Werte für jede Probe berechnet und diese dann gemittelt (Angabe mit Standardabweichungen).

3) Aus den relativen Werten wurde durch Division mit dem kleinsten relativen Wert eine Minimalzusammensetzung berechnet. Um daraus die absolute Zusammensetzung zu berechnen; waren die Werte der Minimalzusammensetzung mit einem sogroßen Faktor zu multiplizieren, daß sich aus der so gewonnenen Anzahl von Aminosäuren das Molekulargewicht berechnen ließ. Dabei sollte noch eine sinnvolle Anzahl von Aminosäuren für die nicht bestimmten übrig bleiben. Für Cystein; Prolin und Tryptophan wurde so eine Gesamtzahl von 96 erhalten.

4) Zur Bestimmung des Einflusses der Leerwerte auf die Aminosäurezusammensetzung von ChAT; wurden die pmol - Werte der Probe als 100% gesetzt und die pmol - Werte der Leerwerte darauf bezogen. Mit Hilfe der absoluten Zusammensetzung von ChAT wurden die % - Werte in Anzahl von Aminosäuren umgerechnet und von den entsprechenden absoluten Werten abgezogen. So wurde die korrigierte Zusammensetzung erhalten.

4.2.2. Bestimmung der N - terminalen Proteinsequenz

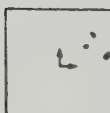
4.2.2.1. Flüssigphasensequenzierung

Durch manuelle Flüssigphasensequenzierung nach Chang (1983) konnte gezeigt werden, daß der N - Terminus des Proteins weder in vivo noch durch die Präparation so stark blockiert worden war, daß die Bestimmung N - terminaler Aminosäuren im pmol - Bereich nicht mehr möglich gewesen wäre. Bei dem dazu verwendeten Verfahren (Fig. 1) handelt es sich um den klassischen Edman - Abbau (1950). Allerdings wurde statt PITC DABITC verwendet. Dieses Reagens ermöglicht den sensitiven Nachweis der Derivate der abgespaltenen Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie. Zur Sequenzierung wurden etwa 300 pmol, bestimmt nach 3.4., des eluierten Enzyms einer nach SDS - Gelkriterien über 98% reinen Isolierung eingesetzt. Als Kontrolle diente ein vergleichbares Aliquot des Leerwertes, der, genau wie in 4.2.1. beschrieben, erhalten wurde. Durch die Lage der Signale der Derivate der abgespaltenen Aminosäuren zueinander und zu den Derivaten der Aminosäurestandards auf den dünnenschichtchromatographischen Auftrennungen konnten die N - terminalen Aminosäuren des dritten und vierten Zyklus eindeutig bestimmt werden. Auf Grund der schlechteren Ausbeute des zweiten Zyklus konnte zwischen Leucin und Isoleucin nicht unterschieden werden. Bei Tryptophan handelte es sich bei diesem Schritt wahrscheinlich um ein Nebenprodukt, da es nur bei doppelter Auftragsmenge auf die Platte nachweisbar war (Fig. 8). Aus diesen Daten ließ sich eine N - terminale Sequenz von ChAT ermitteln (Fig. 9).

I. Zyklus



Leerwert



Probe

2.
1.

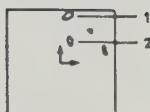
II. Zyklus



Leerwert



Probe

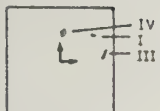


Probe + L



Probe + W

III. Zyklus



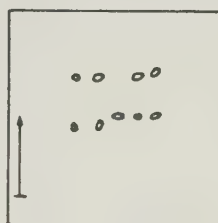
Leerwert



Probe



Probe + F



I I I LL
Probe

Fig. 8 Dünnschichtchromatographie der Derivate der abgespaltenen Aminosäuren

Dazu wurde das Derivat der abgespaltenen Aminosäure nach 3.9. in Ethanol aufgenommen, ein Zwanzigstel bis ein Zehntel davon in die Mitte der Platte aufgetragen, zuerst in Richtung des 1. Pfeils in 1:2 Essigsäure/Wasser und danach in Richtung des 2. in 2:1:1 Toluol/n-Hexan/Essigsäure chromatographiert. Im HCl - Dampf konnte das Aminosäurederivat als roter Fleck sichtbar gemacht werden.

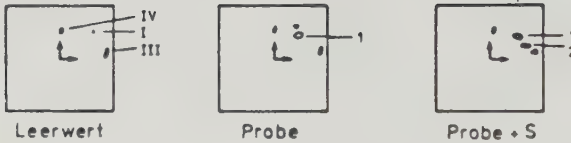
Ausgefüllte Signale: Hintergrund mit I: Glycin, II: Glutaminsäure, III: Histidin oder Arginin oder beides und IV: Nebenprodukt des Reagens

Offene Signale : Signale über dem Hintergrund
im II. Zyklus : 1: Leucin (L) oder Isoleucin
2: Nebenprodukt der Reagenzien
3: Tryptophan (W)

im III. Zyklus : 1: Leucin oder Isoleucin
2: Phenylalanin (F)

Auftrennung von Leucin und Isoleucin wurde auf den gleichen Platten in 100:3 Chloroform/Ethanol durchgeführt

IV. Zyklus



im IV. Zyklus : 1: Glutaminsäure
2: Serin (S)

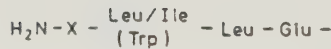


Fig. 9 N - terminale Sequenz von ChAT

X steht für eine Aminosäure die nicht bestimmt werden konnte.

4.2.2.2. Gasphasensequenzierung

Erheblich zeit - und materialsparender kann die N - terminale Proteinsequenz mit Hilfe eines automatisierten Gasphasensequenzators nach Hewick et al. (1981) und Hunkapillar et al. (1983 a) bestimmt werden.

Unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Präparationen von ChAT konnte die Sequenz bis einschließlich des dreizehnten Restes bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 1 100 und 500 pmol eluierte ChAT, bestimmt nach 3.4., zur Sequenzierung eingesetzt. In beiden Fällen standen etwa 250 pmol als freier N - Terminus (Fig. 10) zur Verfügung. Unter Verwendung der ersten Präparation, 90% rein nach SDS -

Gelkriterien, wurden zwei Sequenzen nebeneinander bestimmt. Durch Sequenzierung von 1 650 pmol der schweren Kette des zur Reinigung von ChAT verwendeten Antikörpers wurden sechzehn N - terminale Aminosäuren bestimmt. So konnte eine der beiden Sequenzen diesem Protein zugeordnet (Fig. 12; Fig. 13) und die molekulare Natur der Proteinkontaminanten aus Kapitel 4.1.2. eindeutig aufgeklärt werden. Die zweite Präparation von 95% reinem Material ergab eine einzige Sequenz die mit der zweiten aus der ersten Präparation übereinstimmte. Dadurch konnte nicht nur die durch Flüssigphasensequenzierung bestimmten dritten und vierten N - terminalen Aminosäuren bestätigt, sondern vor allem noch die erste und zweite und fünfte bis dreizehnte N - terminale Aminosäure eindeutig bestimmt werden (Fig. 11; Fig. 13).

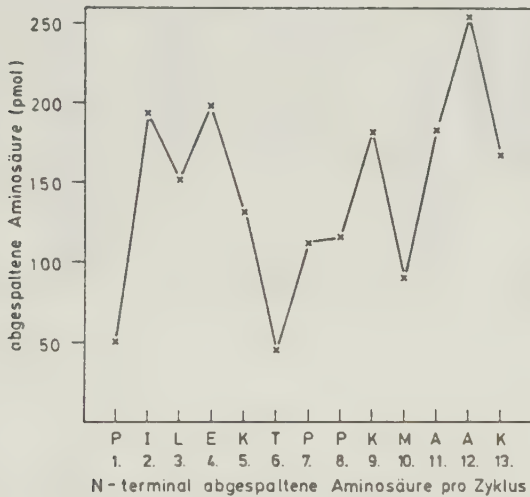


Fig. 10 Ausbeute an Aminosäure pro Sequenzzyklus

Die Menge an abgespaltener Aminosäure im Fall von ChAT wurde, genau wie in der Legende zu Tabelle 4 beschrieben, bestimmt.

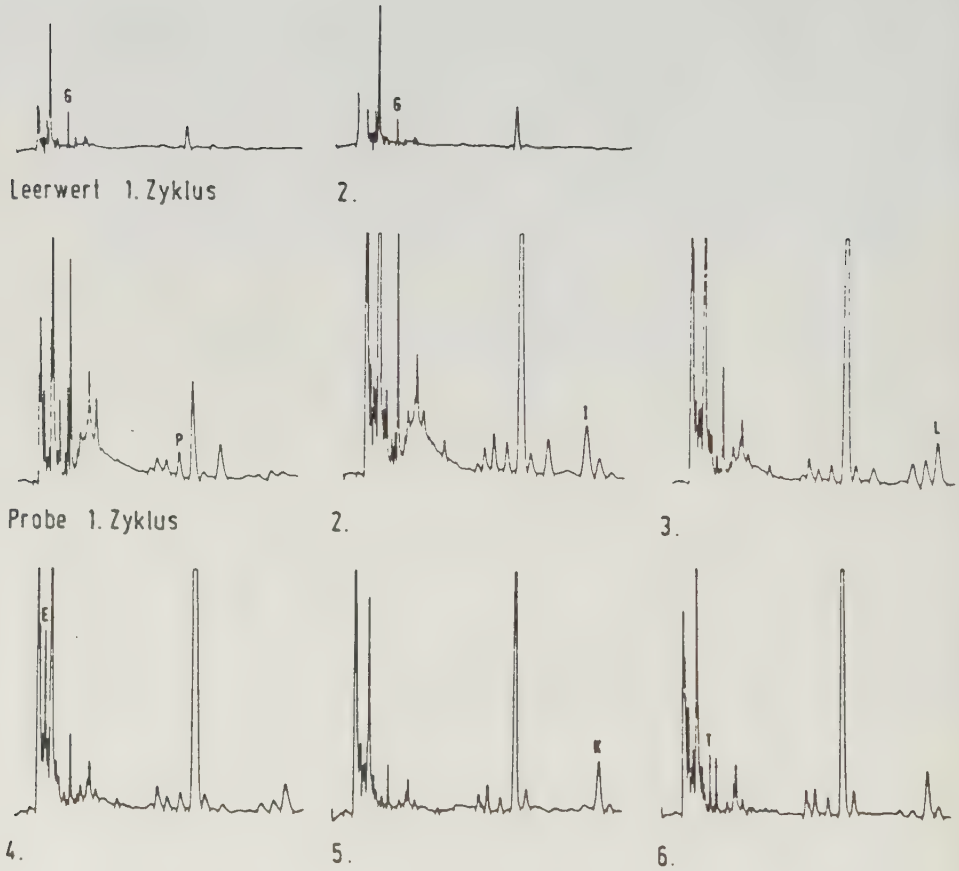
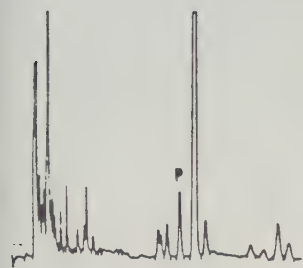
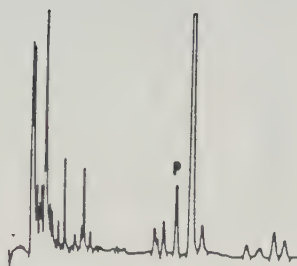


Fig. 11 Chromatogramme (Leerwert 1. und 2. Zyklus; Probe 1. bis 13. Zyklus) der Derivate der N - terminal abgespaltenen Aminosäuren von ChAT

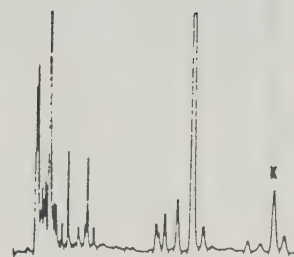
Nachweis der Aminosäurederivate erfolgte wie in 3.10. beschrieben durch HPLC - Chromatographie.



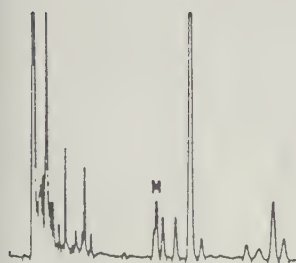
7.



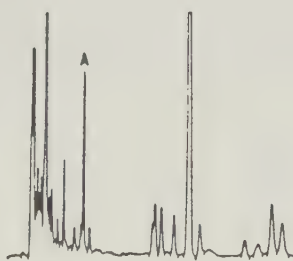
8.



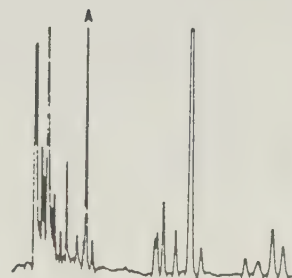
9.



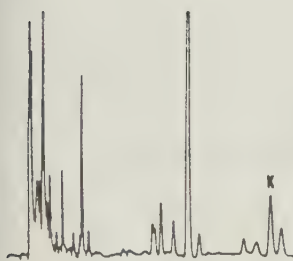
10.



11.



12.



13.

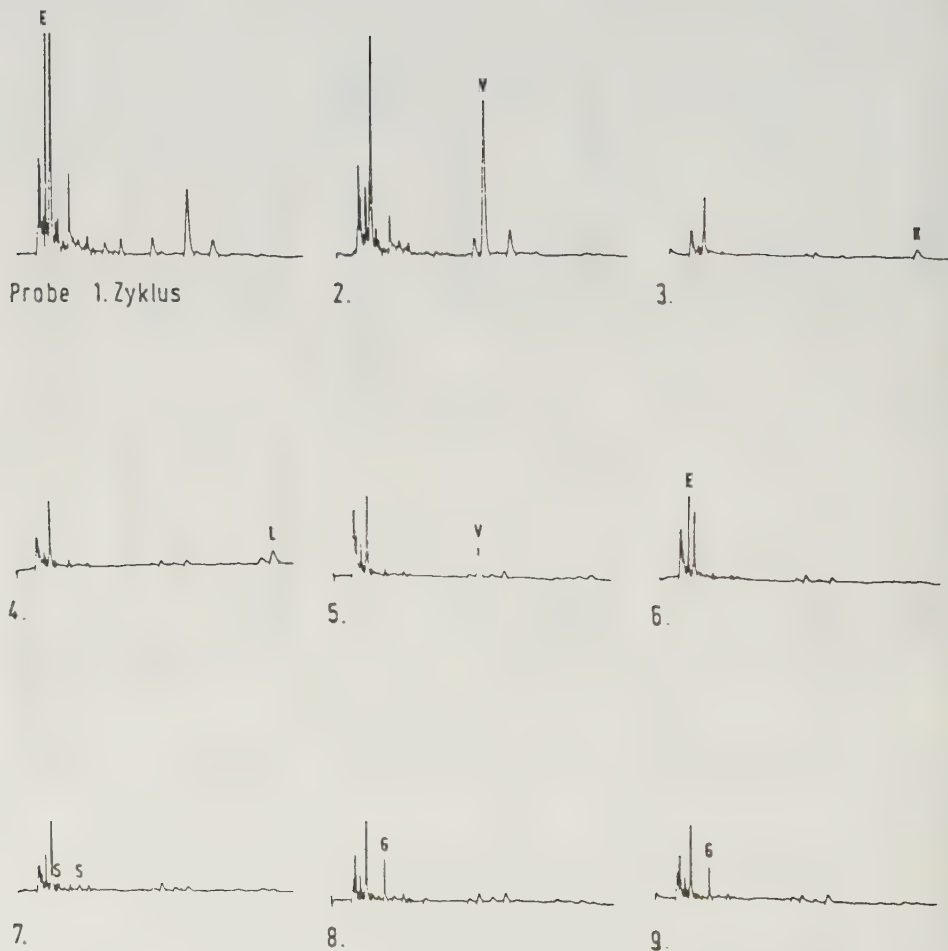
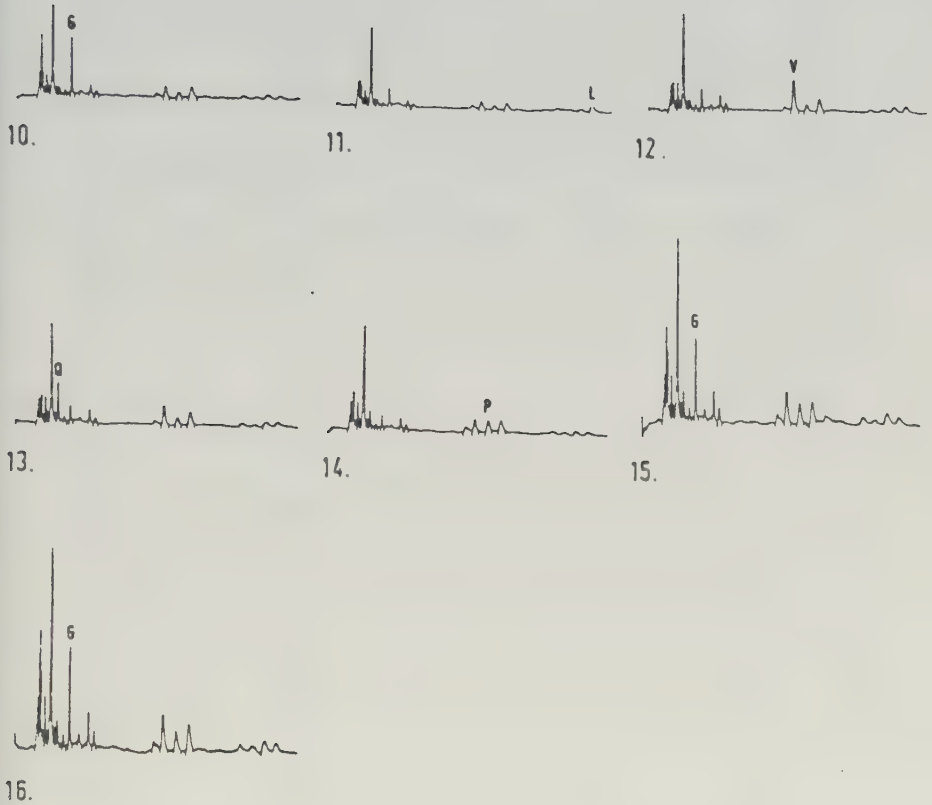


Fig. 12 Chromatogramme (Probe 1. bis 16. Zyklus) der Derivate der N - terminal - abgespaltenen Aminosäuren der schweren Kette des Antikörpers

Nachweis der Aminosäurederivate erfolgte wie in 3.10. beschrieben durch HPLC - Chromatographie.



1.) $\text{H}_2\text{N}-\text{Pro}-\text{Ile}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Lys}-\text{Thr}-\text{Pro}-\text{Pro}-\text{Lys}-\text{Met}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Lys}$

2.) $\text{H}_2\text{N}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Ser}-\text{Gly}-(\text{Gly})-(\text{Gly})-\text{Leu}-\text{Val}-\text{Gln}-\text{Pro}-\text{Gly}-\text{Gly}-$

Fig. 13 N - terminale Sequenzen

1.) ChAT

2.) Schwere Kette des zur Reinigung benützten Antikörpers
Aminosäuren in Klammern konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

4.3. Versuche zum Nachweis der mRNA von ChAT

4.3.1. Synthese und Reinigung des Oligonukleotids CAT/L1

Zum Nachweis der mRNA von ChAT mittels "Northern Blot" nach Thomas (1980) wurde an Hand der N - terminalen Proteinsequenz das unverzweigte Oligonukleotid CAT/L1 mit einer Länge von 38 Basen synthetisiert (Fig. 14). Um das Risiko an Fehlpaarungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde nach Agarwal (1981) für Lysin AAA und für Glutaminsäure GAA als Basentriplett gewählt. Für alle weiteren Aminosäuren wurde nach den statistischen Untersuchungen von Grantham et al. (1981) verfahren. Diese besagen, daß die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Basentriplett für eine entartete Aminosäure von Eukaryontenproteinen in der Nukleinsäuresequenz zu verwenden, bei Proteinen gleicher Funktion größer ist als bei gleicher systematischer Zuordnung der Spezies, aus denen die Proteine isoliert worden sind. Zur endgültigen Festlegung der entsprechenden Triplets wurden nachfolgende Kriterien befolgt.

1. Nach Tabelle 5 wird dasjenige Codontriplett, das bei beiden Transferasen am häufigsten vorkommt, verwendet. In Tabelle 5 wurden nur die Codons derjenigen Aminosäuren berücksichtigt, die in dem zu übertragenden Stück Proteinsequenz vorkommen.
2. Ist nach 1. keine eindeutige Wahl möglich, so wird dasjenige der häufigsten Transferasentriplets gewählt, das mit dem häufigsten Wirbeltier - bzw Schweinetriplett aus Tabelle 5 übereinstimmt.
3. Der G/C - Gehalt des so entworfenen Oligonukleotids sollte nach Heumann et al. (1984) 60% nicht übersteigen.

Tab. 5 Codontripletthäufigkeiten

Aminosäure	Triplet	Häufigkeiten (%) ¹⁾			
		HPRT ²⁾	GST ²⁾	Wirbeltiere ³⁾	Schwein ⁴⁾
Leucin	UUA	10	4	1	2
	UUG	19	22	6	12
	CUU	14	13	5	7
	CUC	14	22	19	23
	CUA	5	0	4	0
	CUG	38	39	63	56
Isoleucin	AUU	81	56	31	43
	AUC	6	33	55	43
	AUA	13	11	14	14
Threonin	ACU	64	13	21	13
	ACC	18	87	60	74
	ACA	18	0	5	13
	ACG	0	0	14	0
Alanin	GCU	11	0	32	23
	GCC	56	80	50	27
	GCA	22	20	8	18
	GCG	11	0	10	32
Prolin	CCU	29	33	28	19
	CCC	29	50	48	58
	CCA	42	17	7	19
	CCG	0	0	17	4

1) 100% entspricht der Gesamtzahl der in den betrachteten Sequenzen vorkommenden Codons einer Aminosäure.

2) Mit Hilfe des Computerprogramms von Devereux et al. (1984) konnte die "University of Wisconsin Genetics Computer Groups" - Datenbank nach dem Codongebrauch von Wirbeltiertransferasen abgesucht werden. Da keine Acyltransferasen gefunden wurden, wurden die Werte der Hypoxanthin - guanin - Phosphoribosyltransferase (HPRT) der Maus und der Glutathion - S - Transferase (GST) der Ratte verwendet.

3) Codontripletthäufigkeiten für Wirbeltiere im allgemeinen, außer Mensch und Immunglobuline, nach Grantham et al. (1981)

4) Für die Spezies Schwein wurde zusätzlich von Hand noch eine Tripletthäufigkeitstabelle unter Verwendung der Protein - und Basensequenzen von Präprocholecystokin nach Gubler et al. (1984), β -Neo-Endorphin/Dynorphin - "precursor" nach Kakidani et al. (1982); Gastrin nach Yoo et al. (1982) und Relaxin nach Haley et al. (1982) erstellt.

- 1.) H₂N - Pro - Ile - Leu - Glu - Lys - Thr - Pro - Pro - Lys - Met - Ala - Ala - Lys
- 2.) 3' GGG-TAA-GAC-CIT-TIT-TGG-GGG-GGG-TIT-TAC-CGG-CGG-TT 5'

Fig. 14 Aminosäuresequenz von ChAT (1.) und Basensequenz des Oligonukleotids CAT/L1 (2.)

Das Oligonukleotid CAT/L1 wurde maschinell mit einer repetitiven Ausbeute von 98% und einer Endausbeute von 58%, bestimmt nach 3.11., synthetisiert (Fig. 15). Nach gelelektrophoretischer Reinigung nach Maxam und Gilbert (1980) mit einer Endausbeute von 54% stand das Oligonukleotid in Form eines Gemisches aus 37 - und 38 - mer zur ³²P - Endmarkierung zur Verfügung. Das 38 - mer war in zehn - bis hundertfach höherer Konzentration als das 37 - mer vorhanden (Fig. 16).

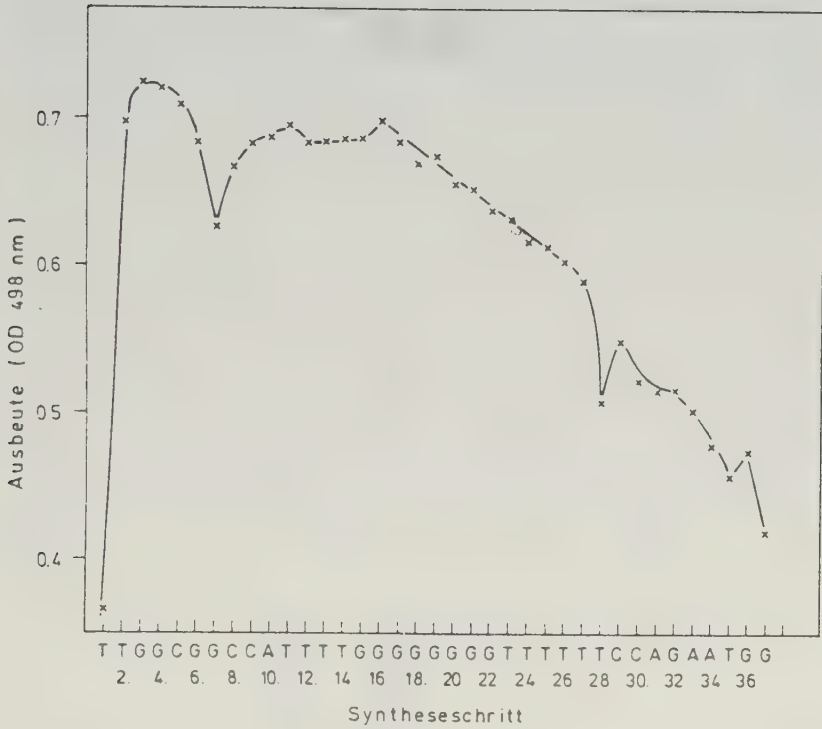
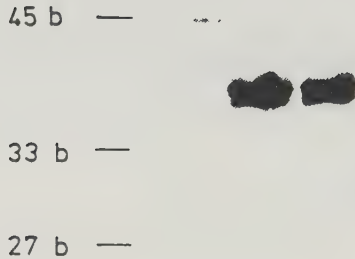


Fig. 15 Ausbeute an Oligonukleotid pro Syntheseschritt

Die Ausbeute wurde, wie in 3.11. beschrieben, durch Tritylbestimmung ermittelt.



1 2 3

Fig. 16 Polyacrylamidgel von CAT/L1 vor und nach der Reinigung

^{32}P - endmarkierte Marker und Oligonukleotide (3.14.; etwa 100 000 cpm) wurden auf einem 8%igen DNA - Sequenzgel aufgetrennt und danach einer Autoradiographie unterzogen. Die Molekulargewichtsmarker wurden nach 3.12. durch enzymatische Spaltung des SP 64 - Plasmids hergestellt.

- 1) Molekulargewichtsmarker (45 b; 33 b, 27 b)
- 2) Gelelektrophoretisch gereinigtes Oligonukleotid
- 3) Oligonukleotid nach der Synthese

4.3.2. Anwendung von CAT/L1 im "Northern Blot"

Ausgehend von 2g Schweinehirnstamm konnten nach 3.15. 1.5mg Gesamt - RNA erhalten werden. Davon wurden durch Oligo - dT - Zellulose - Chromatographie nach Aviv und Leder (1972) 20 μg Poly(A)⁺mRNA; nach 3.16 bestimmt; isoliert. Durch vergleichende "Dotblot" Analyse mit einer Standardpräparation aus der Speicheldrüse der Maus konnte gezeigt werden; daß die nach 3.16. bestimmte Menge an Poly(A)⁺mRNA im gleichen Bereich lag wie die der Standardpräparation (Fig. 17). Dies ist wichtig; da die richtige Menge an Poly(A)⁺mRNA auf dem "Northern Blot" von Bedeutung ist. Denn wird zuviel davon aufgetragen; ist das zu blottende Gel überladen und zeigt dann auf dem Blot zu diffuse Banden. Bei zu wenig RNA wird ein schwaches Signal nicht mehr zu sehen sein. Im übrigen ließ sich so zeigen; daß die Poly(A)⁻RNA - Präparation keine Poly(A)⁺mRNA - Kontamination enthielt. Sie konnte somit als negative Kontrolle zur Überprüfung der Spezifität des Hybridisierungssignals benützt werden.



Fig. 17 "Dotblots" von Poly(A)⁺mRNA und Poly(A)⁻RNA

"Dotblots" wurden nach 3.20. angefertigt.

- 1) Poly(A)⁺mRNA aus der Speicheldrüse der Maus
- 2) Poly(A)⁻RNA aus der Speicheldrüse der Maus
- 3) Poly(A)⁺mRNA aus dem Hirnstamm des Schweins
- 4) Poly(A)⁻RNA aus dem Hirnstamm des Schweins

Von dem so erhaltenen und charakterisierten Material wurden jeweils 20µg Poly(A)⁺mRNA und Poly(A)⁻RNA nach 3.17. glyoxalbehandelt, auf einem 1%igen Agarosegel nach Größe aufgetrennt und nach 3.18. auf Nitrozellulose übertragen. Zum Nachweis der mRNA von ChAT nach Thomas (1980) wurde diese Nitrozellulose nach 3.19. bei 28°C (Fig. 18) 3xSSC und 50% Formamid vorhybridisiert und unter gleichen Bedingungen mit 50 ng ³²P - endmarkierten Oligonukleotid CAT/L1 mit einer spezifischen Aktivität von etwa 1.8x10⁶ cpm/ng hybridisiert. Nach dreimaligem Waschen des Blottes von jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 2xSSC und sieben Minuten bei 35°C mit 0.8xSSC wurde eine diffuse Bande in der Molekulargewichtsregion leicht über 4.7 kb erhalten (Fig. 19). Folgende Kriterien sprechen trotz des schlechten Signal - Rauschverhältnisses des Blots für die Spezifität des Signals. Weder ab einer leicht erhöhten Hybridisierungstemperatur von 33°C und sonst gleichen Bedingungen noch in der Poly(A)⁻RNA - Präparation konnte dieses Hybridisierungssignal nachgewiesen werden. Schließlich wurde der Blot durch Hybridisierung mit einem, auf Grund von Vergleichen der Proteinsequenz nach Dayhoff et al. (1981) und der Basensequenz nach Devereux et al. (1984) mit bekannten Sequenzen; für ChAT spezifischen Oligonukleotid durchgeführt.

$$T_H = T_M - T_{mis}$$

$$T_H = 16.6 \lg Na^+ + 0.41 \lg (\% G + C) + 85.1 - 0.65 \lg (\% \text{Formamid}) - 500 \times (\text{Länge})^{-1} - Y \times 1.3^\circ C$$

Fig. 18 Formel zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur nach Meinkoth und Wahl (1984) unter Ergänzung der Fehlpaarungstemperatur nach Wallace et al. (1979)

T_H: Hybridisierungstemperatur

T_M: Schmelztemperatur

T_{mis}: Temperaturveränderung, bedingt durch eine Fehlpaarung (Y)

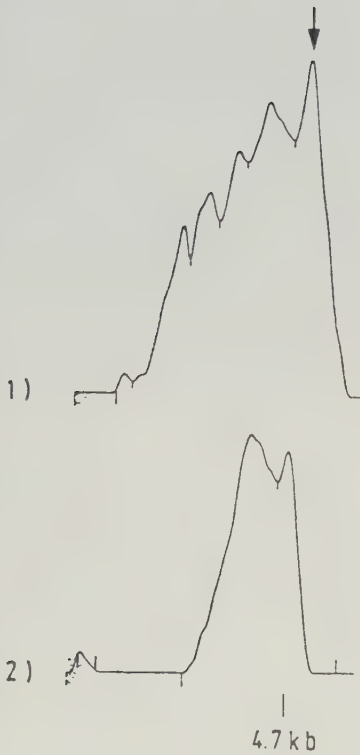


Fig. 19 "Northern Blot" mit CAT/L1

Der "Northern Blot" wurde nach 3.19. mit je 20 μg an Poly(A)⁺mRNA und 20 μg Poly(A)⁻RNA; isoliert nach 3.15. und 3.16. aus Schweinehirnstamm, und 50 ng Oligonukleotid CAT/L1 mit einer spezifischen Aktivität von 1.8×10^6 cpm/ng bei 28°C; 3xSSC und 50% Formamid erstellt. Die Abbildung zeigt eine laserdensitometrische Auswertung der Autoradiographie des Blottes. Intensitätsmaxima sind von links nach rechts mit steigendem Molekulargewicht hin abgebildet. Bei 1) handelt es sich um die Poly(A)⁺mRNA und bei 2) um die Poly(A)⁻RNA. Die fragliche Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5. DISKUSSION

5.1. Vorgehensweise

Um die Grundlage für eine spätere Klonierung von ChAT zu schaffen, standen prinzipiell mehrere Wege zur Verfügung.

Ausgehend von einem Reinigungsfaktor von 10^6 für das Protein wurde der Gehalt der ChAT - mRNA im Gewebe in erster Näherung auch in einem vergleichbaren Größenordnungsbereich angenommen. Kraus und Rosenberg (1982) zeigten, daß eine mRNA - Spezies, die 0.01% der Gesamt - mRNA - Menge darstellte, durch Immunaффinitätschromatographie von in vitro translatierten Polysomen mit spezifischen Antikörpern so angereichert werden konnte, daß anschließende Klonierung möglich wurde. Für ChAT wurde folgender Vorversuch durchgeführt. Die durch ^{35}S - Methionin - Einbau markierten in vitro Translationsprodukte wurden durch ein polyklonales Anti - ChAT - Antiserum gefüllt. Der Niederschlag wurde auf einem SDS - Gel aufgetrennt und davon eine Autoradiographie angefertigt, deren Entwicklungszeit einer mRNA - Konzentration von 0.01% entsprach. Da keine Bande im Bereich von 68 kdal nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, daß entweder das in vitro translatierte Stück Protein die antigenische Determinante nicht oder noch nicht in der richtigen Form enthielt. Viel wahrscheinlicher ist es, daß der hohe Reinigungsfaktor des Proteins einer spezifischen mRNA - Konzentration unter 0.01% entspricht. Aus diesen Gründen wurde ein erfolgversprechenderer Weg für so seltene mRNA - Spezies eingeschlagen.

Bis heute fehlen Proteinsequenzdaten von ChAT. Andererseits wurden von Noda et al. (1982) bei der Klonierung der α - Untereinheit des Acetylcholinrezeptors Oligonukleotide zum erfolgreichen Absuchen von 10^5 Klonen ; entsprechend einer seltenen mRNA, benötigt. Nach einer solchen Vorgehensweise

sollten durch proteinchemische Charakterisierung von ChAT eine spätere Klonierung ermöglicht werden. Diese Methode enthält noch folgende Vorteile. Bei Einsetzen des intakten Proteins ChAT zur Sequenzierung kann der N - Terminus bestimmt werden. Da die aus Schweinehirn so isolierte ChAT ein cytosolisches Protein ist, existiert auch keine N - terminale Signalsequenz. Unter der Annahme, daß die so isolierte Form von ChAT generell nicht von einem Vorgängermolekül abstammt, kann mit Hilfe des N - Terminus der Start der proteinkodierenden Sequenz angegeben werden. Auch der Leserahmen der Nukleinsäuredaten läßt sich damit angeben. Weiterhin können Oligonukleotide nicht nur als Hybridisierungsproben, sondern auch als ChAT spezifische "Primer" für die Reverse Transkriptase oder zur gezielten Mutagenese verwendet werden (Itakura et al. 1984).

5.2. Reinigung

Die molekulare Charakterisierung eines Proteins hat eine spezifische Reinigungsmethode, die mit möglichst geringem Arbeitsaufwand durchführbar ist, zur Voraussetzung. Im Gegensatz zu früheren, sogenannten Reinigungen von ChAT, konnte Rossier (1977) zeigen, daß zur Isolierung von wirklich homogenem Wirbeltierzym ein Reinigungsfaktor im Größenordnungsbereich von 10^5 benötigt werden würde. Vorwiegend durch Verwendung von Immunaффinitätsschromatographie sollte es möglich sein, etablierte Reinigungsmethoden so zu vereinfachen, daß einerseits ein solcher Reinigungsfaktor noch gewährleistet bleibt, andererseits der Arbeitsaufwand für die Reinigung auf ein Minimum reduziert wird. Verwendung von monoklonalen statt polyklonalen Antikörpern nach Köhler und Milstein (1975) sollte das für ChAT extensiv diskutierte Problem der Monospezifität der Antikörper auf ein allgemein anerkanntes Minimum reduzieren (Rossier 1975; Rossier 1981). Im Gegensatz zu Levey et al. (1982) konnte Eckenstein und Thoenen (1982) mit seinem nicht kovalent fixierten Anti -

ChAT - Antikörper aktives Enzym isolieren. Dieser Schritt stellte einen Reinigungsfaktor von über 200 000 dar. Mit kovalent gekoppelten Antikörpern an BrCN - aktivierte Sepharose konnte allerdings keine vergleichbare Anreicherung und Reinheit erreicht werden. In diesem Fall war die Affinität des Antikörpers zum Antigen so stark reduziert, daß unter milden Waschbedingungen, wie 0.5 M NaCl und 0.5% Nonidet P - 40 und einem pH von 8.5, nach fünfunddreißig Säulenvolumina etwa ein Drittel der aufgetragenen ChAT - Aktivität verlorengegangen war. Andererseits waren dann kontaminierende Proteine noch so stark an die Matrix gebunden, daß ein SDS - Polyacrylamidgel des Säuleneluates keinesfalls nur reine ChAT zeigte. Deshalb wurde der bereits erwähnte Immunaффinitätsschritt nach Eckenstein und Thoenen (1982) verwendet. Größere Mengen an Ausgangsmaterial waren auf Grund der zu langen Zeitdauer über die kleinen Säulen von 5 ml Volumen nicht prozessierbar. Eine Vergrößerung der Säulen schied wegen vermindertem Trennvermögens aus (Eckenstein 1982, persönliche Mitteilung). So wurden als erste Schritte die bei Eckenstein et al. (1981) bis zur Dialyse der Ammoniumsulfatfällung des CM - Sephadex - Eluates etablierten Schritte zum Vorreinigen und Ankonzentrieren beibehalten.

Durch HPLC - Gelfiltration an einer LKB TSK 3000 Säule unter stark sauren Bedingungen konnte der Antikörper nicht von ChAT, auf Grund der im Vergleich zu Standardbedingungen reduzierten Trennschärfe, abgetrennt werden. Zusätzlich war die Ausbeute an eluierter ChAT zu gering. ChAT kann dank seiner hydrophobischen Eigenschaften angereichert werden (Eckenstein et al. 1981). Hydrophobische Chromatographie an einer HPLC Beckmann C 3 Säule nach Tempst et al. (1984) versagte ebenfalls; da ChAT nicht mehr von der Säule eluiert werden konnte.

Da SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese den eluierten Komplex auftrennt, sollte das Enzym durch anschließende Elution aus dem entsprechenden Gelstück vom Antikörper abtrennbar sein. Diffusionselution wurde aus zwei Gründen

umgangen: Dazu verwendete Säure kann bei säurelabilen Proteinen zu Spaltungen an Asparaginsäure - Prolin - Bindungen führen (Schenkman et al. 1984). Vor allem aber führt das Zerkleinern der Gelmatrix zum vermehrten Herauslösen von Kontaminanten. Diese, meistens in Form von Polyacrylat, können erheblich bei weiteren Schritten wie HPLC oder Sequenzierung stören (Weiner et al. 1972; Brooks und Sander 1980 und Walker et al. 1982). Polyacrylat kann durch Gelfiltration (Chrambach und Rodbard 1971), durch Fällern des Proteins in Methanol (Stearne et al. 1985) oder durch Binden des Proteins an einen Ionenaustauscher (Brooks und Sander 1980) abgetrennt werden. Beim Arbeiten mit μg - Mengen an Protein empfiehlt es sich aber, die Anzahl weiterer Reinigungsschritte aus Gründen des Materialverlustes möglichst gering zu halten. Viele der in der Literatur beschriebenen elektrophoretischen Elutionsmethoden sind apparativ zu aufwendig zu etablieren, um sie zur Elution nur eines bestimmten Proteins zu testen (Mardian und Isenberg 1978; Koziarz et al. 1978, Bhowen et al. 1980, Hunkapillar et al. 1983 b und Hediger 1984). Der Nachteil anderer Methoden besteht darin, daß sie das zu eluierende Protein durch eine Gelmatrix durchlaufen lassen (Hanoka et al. 1979) und dadurch einen hohen Aminosäurehintergrund erzeugen (Brown und Howard 1980). Dies ist in Hinblick auf eine spätere Sequenzierung zu vermeiden. Darum wurde das in 4.1.2. beschriebene, technisch sehr einfach etablier - und handhabbare System entwickelt.

Auf Grund des hydrophoben Charakters von ChAT (Eckenstein et al. 1981) sollte Elution in SDS - haltigem Puffer von Vorteil sein. Allerdings stellte sich heraus, daß SDS weder durch Dialyse (siehe auch Walker et al. 1982), durch Gelfiltration nach Dianoux et al. (1981) noch durch Extraktion und Fällung nach Wessel und Flügge (1984) oder Salcedo et al. (1983) quantitativ genug abtrennbar war, so daß anschließende Flüssig - oder Gasphasensequenzierung noch möglich gewesen wäre. Abtrennung von SDS durch Verwendung von Dowex - Ionenaustauscher nach Weber und Kuter (1971) war

ebenfalls nicht möglich. Der Verlust an ChAT allein nach diesem Schritt betrug 50%, was zusammen mit der Elutionsausbeute von 25% für die letzten beiden Reinigungsschritte eine Endausbeute von nur 12.5% ergab.

Deswegen wurde eine Lösung von Triethylamin in Wasser zur Elution verwendet. So konnte die Anwesenheit und damit auch die Abtrennung von SDS umgangen werden. Weiterhin wurde so nach Elution und Lyophilisierung der Proben die direkte molekulare Charakterisierung möglich.

Die Ausbeute an eluierter ChAT war bei Verwendung der Proteinnachweismethode nach Hager und Burgess (1980) mit KCl um ein dreifaches höher als nach Higgins und Dahmus (1979). Eine mögliche Erklärung besteht in der Ausbildung eines Protein - SDS - Komplexes, sodaß Spuren von SDS die Aggregatbildung von ChAT im Gelstück verhindern und die Elution erleichtern können. Um eine möglichst gute Abtrennung von ChAT vom Antikörper zu erreichen, durfte das präparative Gel nicht überladen werden. Andererseits führte ein zu geringes Verhältnis von Protein zu Gelmatrix zu Kontaminations - und Proteinmodifizierungsproblemen die im weiteren diskutiert werden.

Die neue Elutionsmethode zeichnet sich nicht durch die Höhe der Elutionsausbeute aus. In der Literatur sind Elutionsmethoden mit besseren Ausbeuten beschrieben (zum Beispiel von Hunkapillar et al. 1983 b). Der Vorteil anderen Methoden gegenüber liegt darin, daß für einen speziellen protein-chemischen Fall, wie zum Beispiel hier für ChAT gezeigt, Elution ohne SDS so durchführbar ist, daß anschließend ohne weitere verlustreiche Abtrennschritte das erhaltene Material direkt chemisch charakterisiert werden kann.

In der Literatur wurden bis jetzt folgende Reinigungen für ChAT, die zu homogener oder fast homogener ChAT führten, beschrieben: von Brandon und Wu 1978 für ChAT aus *Torpedo californica*; von Cozzari und Hartman 1980 (siehe auch Cozzari und Hartman 1983 b) für ChAT aus Rinder Nucleus caudatus; von Dietz und Salvaterra (1980) für ChAT aus

Rattenhirn, von Slemmon et al. (1982) (siehe auch Slemmon et al. 1984) für ChAT aus *Drosophila melanogaster*, von Eckenstein und Thoenen (1982) für ChAT aus Schweinehirn und von Bruce et al. (1985) für ChAT aus menschlicher Plazenta. Außer den Reinigungen von Brandon, Eckenstein und Bruce zeigen alle anderen mehrere gleich intensive Banden auf nicht reduzierenden SDS - Gelen. Sequenzdaten von nach Brandon oder Bruce gereinigter ChAT wurden bis jetzt nicht publiziert. So stellt die hier modifizierte Reinigung von ChAT zur Zeit die einzige dar, welche nachweislich zu sequenzierfähiger ChAT führt.

Folgendes Nebenergebnis der Reinigung sei noch erwähnt. Beobachtungen von Cozzari und Hartman (1983 a) bezüglich der Existenz eines natürlichen Inhibitors von ChAT aus Rinder Nucleus caudatus konnten von mir für ChAT aus Schweinehirn bestätigt werden. Das heißt, daß in beiden Fällen bei zu konzentriertem Auftrag auf den CM - Sephadex - Ionenaustauscher 95%ige Inaktivierung von ChAT eintrat. Durch Modifizierung der Auftragsbedingungen blieb nahezu die gesamte Aktivität von ChAT erhalten.

5.3. Molekulare Charakterisierung

Bis jetzt sind zwei Aminosäurezusammensetzungen für ChAT in der Literatur beschrieben worden. Eine davon wurde von Chao (1975) für die aus Rinder Nucleus caudatus isolierte ChAT (Chao und Wolfgram 1973) publiziert. Nach den Kriterien von Rossier (1981) und den Daten von Eckenstein et al. (1981) scheint es sich auf Grund des um mehrere Größenordnungen zu niedrigen Reinigungsfaktors um eine im besten Fall 0.1% reinen Präparation zu handeln. Damit ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei der von Chao publizierten Aminosäurezusammensetzung um die von ChAT handelt. Die andere Zusammensetzung wurde von Bruce et al. (1985) für ChAT aus menschlicher Plazenta beschrieben.

Die in 4.2.1. gegebenen Daten stellen die erste Aminosäurezusammensetzung für ChAT aus neuronalem Gewebe dar. Die Höhe des Hintergrundes im Leerwert von etwa 3% Asx, Glx, Serin und Alanin entspricht den Werten, die in der Literatur für Proteine, die aus Gelen eluiert worden sind, diskutiert werden (Gibson und Gracy 1979, Brown und Howard 1980). Der hohe Glyzinhintergrundwert ließ sich auch durch Gel-filtration nach Walker et al. (1982) nicht erniedrigen, da die Ausbeute an ChAT bei diesem zusätzlichen Schritt zwischen 0 und 25% schwankte. Da die Höhe des Leerwertes im wesentlichen von den Volumina des Gelstückes und des Eluates abhängig ist, sollte prinzipiell, bei einer erhöhten Menge von Protein pro Gelmatrix - und Elutionsvolumen der Probe, die Höhe des Leerwertes immer weniger ins Gewicht fallen. Im Fall von ChAT konnte allerdings die Menge an Protein pro präparativem Gel auf Grund verminderter Trennschärfe nicht erhöht werden. Die Standardabweichungen der relativen Werte der einzelnen Aminosäuren von durchschnittlich 5% liegen im üblichen Bereich der Fehlergenauigkeit für drei unabhängig voneinander durchgeführte Bestimmungen. Die starken Schwankungen für Methionin von 60% und Tyrosin von 50% resultieren wahrscheinlich aus unterschiedlich starker Oxidation in verschiedenen Proben. Dafür spricht auch, daß ähnlich große Schwankungen für beide oxidationsempfindliche Aminosäuren auftraten. Ein exakter Lysinwert ist generell mit der benützten Methode nur schwer erhältlich. Nach Godel et al. (1984) kommt es bei der Modifizierungsreaktion zu zwei unterschiedlichen Produkten mit jeweils schlechter Fluoreszenzausbeute (siehe auch Fig. 7). Trotzdem stellt die verwendete Methode zur Zeit die zuverlässigste für diesen Sensitivitätsbereich dar (siehe auch Godel et al. 1984).

Vergleicht man diese Aminosäurezusammensetzung mit der von Bruce et al. (1985) für ChAT aus menschlicher Plazenta (Tab. 6), so fällt nur der Wert für Asx als einziger signifikanter Unterschied auf. Höhere Werte für hydrophobe Aminosäuren für ChAT aus Schweinehirn resultieren aus den

besseren Hydrolysebedingungen der verwendeten Methode. Die Glyzinwerte sind auf Grund unterschiedlicher Präparationsbedingungen der Enzyme nicht direkt vergleichbar. Die Unterschiede zwischen allen weiteren Werten liegen durchaus in den Fehlerbreiten der Bestimmungsmethoden. Da zusätzlich die Molekulargewichte gleich sind und die isoelektrischen Punkte sehr wahrscheinlich im gleichen Bereich liegen, handelt es sich sehr wahrscheinlich in beiden Fällen um das gleiche Enzym mit ähnlicher, möglicherweise sogar gleicher Struktur und Funktion.

Tab. 6 Aminosäurezusammensetzungen

Aminosäure	Plazenta - ChAT	Schweinehirn - ChAT
Asx	38	53
Glx	66	70
Ser	42	38
Gly	34	31
Thr	31	27
His	9	15
Ala	43	41
Arg	33	36
Tyr	15	10
Val	34	39
Met	9	6
Ile	17	22
Phe	21	24
Leu	62	61
Lys	31	41
Pro	47	-
Cys	-	-
Trp	-	-

Da meist nur Proteinmengen im pmol - Bereich zur Verfügung standen, konnten analytische enzymatische Spaltungsversuche

nur im Bereich von 2 bis 5 μg pro Versuch durchgeführt werden. Da weiterhin 10 μl die untere Grenze einer vernünftig handhabbaren Flüssigkeitsmenge darstellen, wären Proteasen im Bereich von 0.02 bis 0.05 μg pro μl einzusetzen gewesen. Dies war aus Gründen der Inaktivierung durch zu starke Verdünnung nicht möglich (Allen 1981). Deshalb wurde durch chemische Spaltung mit BrCN an Methionin versucht, Peptide zu erzeugen. Trotz Optimierung der Spaltungsbedingungen in Hinblick auf Wahl des Lösungsmittels, Konzentration an BrCN und Protein, Verhältnis der beiden zueinander und Reaktionszeit, war es nicht möglich bei 100%igem Abbau die Ausbeute an einzelnen Peptiden, bestimmt durch SDS - Polyacrylamidgradientengele, über etwa 15% zu steigern. Auf Grund der zur Verfügung stehenden Mengen an ChAT war die Trennung der in diesen Ausbeuten anfallenden Fragmente nicht durchführbar.

Deswegen wurde mit Hilfe der N - terminalen Sequenzierung versucht, Daten zur Konstruktion von Oligonukleotiden zu erhalten. Daß von 500 pmol an eingesetztem Material nur maximal etwa 250 pmol Aminosäuren gefunden wurden, läßt sich mit der Ungenauigkeit der Abschätzung der eingesetzten Proteinmenge nach 3.4. erklären. Daß für Prolin im ersten Zyklus nur 50 pmol gefunden wurden, erklärt möglicherweise auch, warum die Aminosäure des ersten Zyklus durch manuelle Sequenzierung nach Chang (1983) nicht nachgewiesen werden konnte. Trotzdem stellt diese Art von Sequenzierung eine sensitive Methode dar, um isolierte Proteine auf ihre N - terminale Sequenzierbarkeit zu testen, falls nicht unmittelbar ein Gasphasensequenator zu Verfügung steht. Daß von 1 100 pmol allerdings ebenfalls nur etwa 250 pmol gefunden wurden, resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit aus folgender Tatsache. Bei der Isolierung der hierzu verwendeten Präparation wurden auf das präparative Gel nur ein Siebtel der ursprünglichen Menge an ChAT aufgetragen. Begünstigt durch das schlechte Verhältnis von Protein - zu Gelmatrixmenge wurde möglicherweise, trotz Anwesenheit von

Thioglykolat, ein Teil des Proteins N - terminal blockiert. Dies wurde auch mehrfach in der Literatur diskutiert ((Weiner et al. (1972), Schechter et al. (1975), Kelly et al. (1983) und Hunkapillar et al. (1983 b)). Somit läßt sich auch keine Verbesserung der Reinheit von, aus dem Gel eluierter ChAT durch weitere Verminderung der Auftragsmenge auf das Gel erreichen. Daß nicht mehr als dreizehn Zyklen durchgeführt werden konnten, ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Polyacrylat zurückzuführen (Stearne et al. 1985). Molekulare Wechselwirkungen von Protein und Polyacrylat erklären möglicherweise auch die Tatsache, daß diese Kontaminanten in wesentlich größerem Ausmaß in den Proben als in den Leerwerten gefunden wurden. Wie bereits im Fall der Aminosäurezusammensetzung, konnte der Hintergrund durch Gelfiltration nicht beseitigt werden, da zuwenig ChAT und nur unzuverlässig von der Säule kam. Ein besseres Signal - Rauschverhältnis der Chromatogramme der Derivate der abgespaltenen Aminosäuren durch Anwendung des OPA - Blocks nach Brauer et al. (1984) zu erhalten, war auf Grund eines dabei vergleichbar hohen Hintergrundes ebenfalls nicht möglich. Andererseits konnten gerade auch wegen des hohen Molekulargewichts von ChAT nicht mehr Schritte sequenziert werden; da erwartungsgemäß bei größeren Proteinen auch die Anzahl säurelabiler Asparaginsäure - Prolin - Bindungsstellen und damit die Spaltungsmöglichkeiten während des Edman - Abbaus zunehmen. Dies führt dann zu neuen N - Termini, sodaß die weitere eindeutige Identifizierung der entsprechenden Aminosäure nicht mehr möglich ist. Dies wurde auch bei ChAT ab dem vierzehnten Zyklus beobachtet.

Die Sequenzdaten stellen die ersten für ChAT in der Literatur beschriebenen dar. Wie bereits zu Beginn der Diskussion ausgeführt, können diese Sequenzdaten sowohl zur Konstruktion von Oligonukleotiden wie zur Festlegung des Lesemusters von Nukleinsäuredaten und des Starts der proteinkodierenden Sequenz verwendet werden.

5.4. Versuche zum Nachweis der mRNA von ChAT

Wie bereits in 5.1. diskutiert, war der Nachweis der ChAT mRNA durch Immunfällung von Polysomen nicht möglich. So wurde zu ihrem Nachweis von der Proteinsequenzinformation ausgegangen. Auf Grund der Entartung des genetischen Codes können Oligonukleotide in zweierlei Weise verwendet werden. Einerseits in Form von Mischungen von fünfzehn bis achzehn Basen langen Oligonukleotiden, die allen Codonkombinationsmöglichkeiten entsprechen ((zum Beispiel Wallace et al. (1981)). Andererseits können nach Jaye et al. (1983) und Anderson und Kingston (1983) unverzweigte, möglichst lange Oligonukleotide verwendet werden. Erstere Überlegung mußte verworfen werden, da die einzige fünf aminosäurenlange Sequenz mit minimalem Entartungsgrad an Hand eines Sequenzvergleichs mittels Computerdatenbank nach Dayhoff et al. (1981) 80% Sequenzhomologie zu bereits sequenzierten eukaryotischen Proteinen zeigte. Diese waren das FOS - Transformierende Protein, Myoglobin, Histon H1, Keratin Typ I, das chromosomale Protein H6, ein Calciumbindendes Protein und die Alpha - Fetoprotein - "precursor" verschiedener Spezies. Im übrigen wird bei Verwendung einer Mischung von mehreren Oligonukleotiden die tatsächliche Konzentration des richtigen Oligonukleotids so stark reduziert, daß das im Fall von seltenen mRNAs zu Sensitivitätsproblemen führt. Ein langes Oligonukleotid hat weiterhin den Vorteil vor einem kurzen, daß ein größerer Anteil an Fehlpaarungen toleriert wird. Da keine Daten über den Codongebrauch eukaryotischer Acyltransferasen in den Datenbanken von Devereux et al. (1984) und Dayhoff et al. (1981) zu finden waren, wurde nach Grantham et al. (1981) davon ausgegangen, daß den Codonhäufigkeitsdaten eukaryotischer Transferasen noch Vorrang vor denen von Wirbeltierproteinen im allgemeinen und Schweineproteinen eingeräumt werden sollten. So wurden die in 4.3.1. verwendeten Kriterien aufgestellt.

mRNA wurde aus Schweine - bzw Rattenhirnstamm isoliert, da nach Mallet (persönliche Mitteilung 1985) in dieser Hirnregion in der Ratte die höchste ChAT - mRNA - Konzentration gefunden wurde. Diese Daten stammen von Messungen der ChAT - Aktivität von in vitro Translationsprodukten von mit mRNA injizierten Oocyten.

Zur Qualität des Signal - Rauschverhältnisses im "Northern Blot" ist generell zu sagen, daß bei Verwendung von Oligonukleotiden auf Grund der geringeren Stabilität der DNA/RNA - Hybride im Vergleich zu cDNA - Proben nicht so drastische Hybridisierungsbedingungen angewendet werden können. Ein Teil des Hintergrundes im Bereich der Poly(A)⁻RNA wie der Poly(A)⁺mRNA rührt höchst wahrscheinlich aus unspezifischer Hybridisierung des Oligonukleotids mit 28 S - rRNA und ihren Abbauprodukten her, da die Poly(A)⁺mRNA meist mit Poly(A)⁻RNA kontaminiert ist. Unspezifische Hybridisierung erklärt sich aus dem hohen G/C - Anteil des Oligonukleotids CAT/L1 und der 28 S rRNA (Chan et al. 1983). Ob es sich bei dem leicht über 4.7 kb liegenden Signal um die mRNA von ChAT handelt, ließe sich allerdings erst nach folgenden weiteren Versuchen mit größerer Sicherheit sagen. Das gleiche Signal sollte auch mit weiteren sequenzspezifischen Oligonukleotiden oder besser noch mit einer cDNA von ChAT erhalten werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Isolierung der mRNA aus dem Gel und Messung der ChAT - Aktivität und Immunfällung des davon in vitro translatierten Proteins. Sollte sich die Länge der mRNA von ChAT wirklich in diesem Größenordnungsbereich bewegen, ließe sich ein schwaches Signal im Blot außer durch die geringe Konzentration an spezifischer mRNA im Ausgangsmaterial noch durch verminderte Transferausbeute für lange RNAs vom Gel auf die Nitrozellulose erklären. Im übrigen würde eine solche Länge gut zu den Ergebnissen von Milner und Sutcliffe (1983) passen. Sie konnten zeigen, daß in der Regel hirnspezifische mRNAs der Ratte länger sind als die für andere Gewebetypen spezifische.

Unter der Annahme der Spezifität des Oligonukleotids CAT/L1 sollte es sich zur Isolierung eines ChAT - Klonen aus einer Genbank eignen. Als spezifischer "Primer" oder zur Isolierung eines ChAT - cDNA Klonen ist es nicht geeignet. Dazu müßte die zu Grunde liegende Proteinsequenz von der C - terminalen Region des Proteins stammen. Um den eindeutigen Nachweis von ChAT spezifischen Klonen einer späteren Klonierung zu erleichtern, sollten außer CAT/L1 noch weitere Oligonukleotide verwendet werden. Dazu könnte ChAT nach der hier beschriebenen Reinigungsmethode isoliert werden. Von Fragmenten würde die Proteinsequenz, in gleicher Weise wie hier für das N - terminale Ende beschrieben, erstellt werden. Die Proteinsequenzen würden dann nach den hier erstellten Kriterien in Nukleinsäuresequenzen übertragen werden. Klonierung von ChAT in einem Expressionsvektor hätte den Vorteil, daß ChAT - Klone dann durch Verwendung der oben beschriebenen Oligonukleotide wie des zur Reinigung benützten Antikörpers nachgewiesen werden könnten.

6. LITERATUR

- Agarwal, K.L., Brunstedt, J. & Noyes, B.E. (1981) A general method for detection and characterization of an mRNA using an oligonucleotide probe. *J. Biol. Chem.* 256, 1023 - 1028
- Allen, G. (1981) in *Sequencing of proteins and peptides* (Work, T.S. & Burdon R.H. ed.), pp. 53 - 61 Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Anderson, S. & Kingston, I.B. (1983) Isolation of a genomic clone for bovine pancreatic trypsin inhibitor by using a unique-sequence synthetic DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6838 - 6842
- Aviv, H. & Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid - cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408 - 1412
- Beaucage, S.L. & Caruthers, M.H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 22, 1859 - 1862
- Bhown, A.S., Mole, J.E., Hunter, F. & Bennett, J.C. (1980) High - sensitivity sequence determination of proteins quantitatively recovered from sodium dodecyl sulfate gels using an improved electrodialysis procedure. *Anal. Biochem.* 103, 184 - 190
- Black, I.B., Adler, J.E., Dreyfus, C.F., Jonakait, G.M., Katz, D.M., LaGamma, E.F. & Markey, K.M. (1984) Neurotransmitter plasticity at the molecular level. *Science* 225, 1266 - 1270
- Brandon, C. & Wu, J.-Y. (1978) Purification and properties of choline acetyltransferase from Torpedo Californica. *J. Neurochem.* 30, 791 - 797
- Brauer, A.W., Oman, C.L. & Margolies, M.N. (1984) Use of o - phthalaldehyde to reduce background during automated edman degradation. *Anal. Biochem.* 137, 134 - 142
- Brooks, K.P. & Sander, E.G. (1980) Preparative polyacrylamide gel electrophoresis: removal of polyacrylate from proteins. *Anal. Biochem.* 107, 182 - 186
- Brown, W.E. & Howard, G.C. (1980) Amino acid composition of proteins eluted from polyacrylamide gels: background considerations. *Anal. Biochem.* 101, 294 - 298

- Bruce, G., Wainer, B.H. & Hersh, L.B. (1985) Immunoaffinity purification of human choline acetyltransferase: comparison of the brain and placental enzymes. *J. Neurochem.* 45, 611 - 620
- Chan, Y.-L., Olvera, J. & Wool, I.G. (1983) The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 7819 - 7831
- Chang, J.Y. (1983) Manual micro - sequence analysis of polypeptides using dimethylaminoazobenzene isothiocyanate. *Methods Enzymol.* 91, 455 - 466
- Chao, L.-P. & Wolfgram, F. (1973) Purification and some properties of choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6) from bovine brain. *J. Neurochem.* 20, 1075 - 1081
- Chao, L.-P. (1975) Subunits of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 25, 261 - 266
- Chrambach, A. & Rodbard, D. (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* 172, 440 - 451
- Cozzari, C. & Hartman, B.K. (1980) Preparation of antibodies specific to choline acetyltransferase from bovine caudate nucleus and immunohistochemical localization of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7453 - 7457
- Cozzari, C. & Hartman, B.K. (1983 a) An endogenous inhibitory factor for choline acetyltransferase. *Brain Res.* 276, 109 - 117
- Cozzari, C. & Hartman, B.K. (1983 b) Choline Acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 258, 10013 - 10019
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acid sequence database. *DNA* 1, 51 - 58
- Devereux, J., Haerberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387 - 395
- Dianoux, A.-C., Vignais, P.V. & Tsugita, A. (1981) Partial proteolysis of the natural ATPase inhibitor from beef heart mitochondria. *FEBS Lett.* 130, 119 - 123
- Dietz, G.W. & Salvaterra, P.M. (1980) Purification and peptide mapping of rat brain choline acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 255, 10612 - 10617
- Eckenstein, F., Barde, Y.-A. & Thoenen, H. (1981) Production of specific antibodies to choline acetyltransferase purified from pig brain. *Neuroscience* 6, 993 - 1000

- Eckenstein, F. & Thoenen, H. (1982) Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO J.* 1, 363 - 368
- Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283 - 293
- Fonnum, F. (1975) A rapid method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, 407 - 409
- Fukada, K. (1985) in *Hormones and Cell Regulation* (Dumont, J.E., Hamprecht, B. & Nunez, J. ed.) 9, pp.377 - 384 Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Fulton, J.F. & Nachmansohn, D. (1943) Acetylcholine and the physiology of the nervous system. *Science* 97, 569 - 571
- Furshpan, E.J.; MacLeish, O. Laque, P.H. & Potter, D.D. (1976) Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic and dual - function neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4225 - 4229
- Gibson, D.R. & Gracy, R.W. (1979) Extraction of proteins and peptides from coomassie blue - stained sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 96, 352 - 354
- Godel, H.; Graser, T.; Földi, P.; Pfaender, P. & Furst, P. (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by high - performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 297, 49 - 61
- Grantham, R.; Gautier, C.; Jacobzone, M. & Mercier, R. (1981) Codon catalogue usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* 9, r43 - r74
- Grima, B.; Lamouroux, A.; Blanot, F.; Biguet, N. F. & Mallet, J. (1985) Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 617 - 621
- Gubler, U.; Chua, A.O.; Hoffman, B.J.; Collier, K.J. & Eng, J. (1984) Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4307 - 4310
- Hager, D.A. & Burgess, R.R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of escherichia coli RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109, 76 - 86
- Haley, J.; Hudson, P.; Scanlon, D.; John, M.; Cronk, M., Shine, J., Tregear, G. & Niall, H. (1982) Porcine relaxin: molecular cloning and cDNA structure. *DNA* 1, 155 - 162

- Hanaoka, F., Shaw, J.L. & Mueller, G.C. (1979) Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 99, 170 - 174
- Hediger, M.A. (1984) Apparatus and method for preparative gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 142, 445 - 454
- Heumann, R., Korsching, S. & Thoenen, H. (1984) Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J.* 3, 3183 - 3189
- Hewick, R.M., Hunkapillar, M.W., Hood, L.E. & Dreyer, W.J. (1981) A gas - liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256, 7990 - 7997
- Higgins, R.C. & Dahmus, M.E. (1979) Rapid visualization of protein bands in preparative SDS - polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 93, 257 - 260
- Hunkapillar, M.W., Hewick, R.M., Dreyer, W.J. & Hood, L.E. (1983 a) High - sensitivity sequencing with a gas - phase sequenator. *Methods Enzymol.* 91, 399 - 413
- Hunkapillar, M.W., Lujan, E., Ostrander, F., Hood, L.E. (1983 b) Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol.* 91, 227 - 236
- Itakura, K., Rossi, J.J. & Wallace, B. (1984) Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 323 - 356
- Jaye, M., de la Salle, H., Schamber, F., Balland, A., Kohli, V., Findeli, A., Tolstoshev, P. & Lecocq, J.-P. (1983) Isolation of a human anti-haemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic oligonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX. *Nucleic Acids Res.* 11, 2325 - 2335
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. & Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298, 245 - 249
- Kandel, E. (1983) Neurobiology and molecular biology: the second encounter. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18, 891 - 908
- Kelly, C., Totty, N.F., Waterfield, M.D. & Crumpton, M.J. (1983) Amino acid sequencing of polypeptides eluted from 2D polyacrylamide gels. *Biochemistry Int.* 6, 535 - 543
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495 - 497

Koziarz, J.J., Köhler, H. & Steck, T.L. (1978) A system for preparative polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 86, 78 - 89

Kraus, J.P. & Rosenberg, L.E. (1982) Purification of low-abundance messenger RNAs from rat liver by polysome immunoadsorption. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4015 - 4019

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680 - 685

Lamoureux, A., Faucon Biguet, N., Samolyk, D., Privat, A., Salomon, J.C., Pujol, J.F. & Mallet, J. (1982) Identification of cDNA clones coding for rat tyrosine hydroxylase antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3881 - 3885

Landis, S.C. (1983) Development of cholinergic sympathetic neurons: evidence for transmitter plasticity in vivo. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 42, 1633 - 1638

Levey, A.I., Rye, D.B. & Wainer, B.H. (1982) Immunochemical studies of bovine and human cholin-o-acetyltransferase using monoclonal antibodies. J. Neurochem. 39, 1652 - 1659

Lottspeich, F. (1985) Microscale isocratic separation of phenylthiohydantoin amino acid derivatives. J. Chromatogr. 326, 321 - 327

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Lundberg, J.M. & Hökfelt, T. (1983) Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. Trends in Neurosci. 8, 325 - 333

Mallet, J., Faucon Biguet, N., Lamoureux, A. & Samolyk, D. (1983) Detection and regulation of Tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat adrenal medulla and brain tissues. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18, 305 - 308

Malte-Sørenssen (1979) Recent progress in the biochemistry of choline acetyltransferase. Prog. Brain Res. 49, 45 - 58

Mardian, J.K.W. & Isenberg, I. (1978) Preparative gel electrophoresis: detection, excision and elution of protein bands from unstained gels. Anal. Biochem. 91, 1 - 12

Matteucci, M.D. & Caruthers, M.H. (1981) Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 - 3191

Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end - labeled

DNA with base - specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65, 499 - 560

Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138, 267 - 284

Melera, P.W. & Rusch, H. P. (1973) A characterization of ribonucleic acid in the myxomycete *Physarum polycephalum*. Expt. Cell Res. 82, 197 - 209

Milner, R.J. & Sutcliffe (1983) Gene expression in rat brain. Nucleic Acids Res. 11, 5497 - 5520

Nachmansohn, D. & Machado, A.L. (1943) The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline Acetylase". J. Neurophys. 6, 397 - 404

Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toysato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S. (1982) Primary structure of α -subunit precursor of torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. Nature 299, 793 - 797

Oesch, F., Otten, U. & Thoenen, H. (1973) Relationship between the rate of axoplasmic transport and subcellular distribution of enzymes involved in the synthesis of norepinephrin. J. Neurochem. 20, 1691 - 1706

Patterson, P.H. & Chun, L.L.Y. (1974) The influence of non-neuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3607 - 3610

Patterson, P.H. (1979) Environmental determination of neurotransmitter functions in developing sympathetic neurons. Prog. Brain Res. 51, 75 - 82

Reichardt, L.F. & Patterson, P.H. (1977) Neurotransmitter synthesis and uptake by isolated sympathetic neurones in microcultures. Nature 270, 147 - 151

Righetti, P.G. & Caravaggio, T. (1976) Isoelectric points and molecular weights of proteins. J. Chromatogr. 127, 1 - 28

Rossier, J. (1975) Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase: real or artefact? Brain Res. 98, 619 - 622

Rossier, J. (1977) Choline acetyltransferase: a review with special reference to its cellular and subcellular localization. Int. Rev. Neurobiol. 20, 283 - 337

Rossier, J. (1981) Serum monospecificity: a prerequisite for reliable immunohistochemical localization of neuronal markers

including choline acetyltransferase. *Neuroscience* 6, 989 - 991

Salcedo, J.R.; Hernandez, R.S. & Celis, H. (1983) Extraction of detergents from hydrophobic proteins with Isopentanol: application to electrophoretic analysis of photosynthetic bacterial hydrophobic proteins. *Anal. Biochem.* 132, 324 - 327

Schechter, I.; McKean, D.J.; Guyer, R. & Terry, W. (1975) Partial amino acid sequence of the precursor of immunoglobulin light chain programmed by messenger RNA in vitro. *Science* 188, 160 - 162

Schenkman, S.; Tsugita, A.; Schwartz, M. & Rosenbusch, J.P. (1984) Topology of phage receptor protein. *J. Biol. Chem.* 259, 7570 - 7576

Slemmon, J.R.; Salvaterra, P.M.; Crawford, G.D. & Roberts, E. (1982) Purification of choline acetyltransferase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 257, 3847 - 3852

Slemmon, J.R.; Salvaterra, P.M. & Roberts, E. (1984) Molecular characterization of choline acetyltransferase from *Drosophila Melanogaster*. *Neurochem. Int.* 6, 519 - 525

Stearne, P. A.; van Driel, I.R.; Grego, B.; Simpson, R.J. & Goding, J.W. (1985) The murine plasma cell antigen pc - 1: purification and partial amino acid sequence. *J. Immunol.* 134, 443 - 448

Tempst, P.; Hunkapiller, M.W. & Hood, L.E. (1984) Separation of peptides by reverse - phase high - performance liquid chromatography using propyl - and cyanopropylsilyl supports. *Anal. Biochem.* 137, 188 - 195

Thoenen, H.; Mueller, R.A. & Axelrod, J. (1969) Trans - synaptic induction of adrenal tyrosine hydroxylase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 169, 249 - 254

Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201 - 5205

Tsugita, A. & Scheffler, J.-J. (1982) A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *Eur. J. Biochem.* 124, 585 - 588

Tubbs, P.K. & Garland, P.B. (1969) Assay of Coenzyme A and some acyl derivatives. *Methods Enzymol.* 13, 535 - 551

Tullis, R.H. & Rubin, H. (1980) Calcium protects DNase I from proteinase K: a new method for the removal of contaminating RNase from DNase I. *Anal. Biochem.* 107, 260 - 264

Walker, J.E., Auffret, A.D., Carne, A., Gurnett, A., Hanisch, P., Hill, D. & Saraste, M. (1982) Solid - phase sequence analysis of polypeptides eluted from polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 123, 253 - 260

Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ϕ X174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543 - 3557

Wallace, R.B., Johnson, M.J., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H. & Itakura, K. (1981) The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit - globin DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 879 - 894

Weber, K. & Kuter, D.J. (1971) Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 246, 4504 - 4509

Weber, M.J. (1981) A diffusible factor responsible for the determination of cholinergic functions in cultured sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 256, 3447 - 3453

Weiner, A.M., Platt, T., Weber, K. (1972) Amino - terminal sequence analysis of proteins purified on a nanomole scale by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 247, 3242 - 3251

Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141 - 143

White, B.A. & Bancroft, F.C. (1982) Cytoplasmic dot hybridization. *J. Biol. Chem.* 257, 8569 - 8572

Yoo, O.J., Powell, C.T. & Agarwal, K.L. (1982) Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA coding for porcine gastrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1049 - 1053

LEBENS LAUF

- 22.10.1955 Geboren in Ludwigshafen am Rhein als Sohn des Elektroingenieurs Heinrich Braun und seiner Frau Liselotte, geborene Stillger
- 1962 - 1966 Besuch der Grundschule in Ludwigshafen
- 1966 - 1974 Besuch des mathematisch - naturwissenschaft - lichen Max - Planck - Gymnasiums in Ludwigs - hafen
- 1974 - 1975 Studium der Chemie an der Rupprecht - Karl - Universität in Heidelberg
- 1975 - 1976 Ableistung des Grundwehrdienstes
- 1976 - 1979 Weiterstudium und Vordiplom in Chemie an der Rupprecht - Karl - Universität in Heidelberg
- 1977 - 1979 Studium und Zwischenprüfung in Philosophie an der Rupprecht - Karl - Universität in Heidelberg
- 1979 - 1981 Weiterstudium der Chemie an der Ludwig - Maximilians - Universität in München
- 1981 - 1982 Diplomarbeit in Biochemie mit dem Thema "Citrat - Synthase aus Escherichia Coli - Isolierung, Charakterisierung und Kristal - lisation" am Max - Planck - Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Röntgenstrukturanalyse von Prof. Dr. R. Huber
- 1982 Diplom in Chemie (Wahlfach: Theoretische Chemie)
- 1982 - 1986 Doktorarbeit in Biochemie mit dem Thema "Molekulare Charakterisierung von Cholin - Acetyltransferase aus Schweinehirn" am Max - Planck - Institut für Psychiatrie in Martinsried in der Abteilung Neurochemie von Prof. Dr. H. Thoenen

